

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

**CARACTERIZAÇÃO DE TcKAP7: UMA PROTEÍNA ASSOCIADA AO
CINETOPLASTO DO PROTOZOÁRIO *Trypanosoma cruzi***

CURITIBA

2015

FLÁVIA SOUZA MORINI

**CARACTERIZAÇÃO DE TcKAP7: UMA PROTEÍNA ASSOCIADA AO
CINETOPLASTO DO PROTOZOÁRIO *Trypanosoma cruzi***

Tese apresentada ao Curso de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Dr. Stenio Perdigão Fragoso

CURITIBA

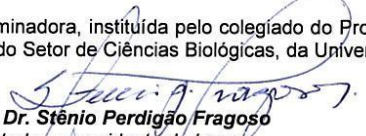
2015

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)


PARECER


A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:


Prof. Dr. Stênio Perdigão Fragozo
Orientador e presidente da banca
Instituto Carlos Chagas - ICC


Profa. Dra. Inianê Eger
Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG


Profa. Dra. Sheila Cristina Nardelli
Instituto Carlos Chagas - ICC


Prof. Dr. Luis Gustavo Morello
Instituto Carlos Chagas - ICC


Prof. Dr. Augusto Sávio Ramos
Instituto Carlos Chagas - ICC

E tendo como suplentes,


Profa. Dra. Gisele Fernanda Assine Picchi
Instituto Carlos Chagas - ICC

Prof. Dr. Alejandro Correa Domingues
Instituto Carlos Chagas - ICC

Após arguir a candidata **Flávia Souza Morini**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Caracterização de TcKAP7: uma proteína associada ao cinetoplasto do protozoário *Trypanosoma cruzi*", são de parecer favorável à Aprovação da acadêmica, habilitando-a ao título de Doutora em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em Biologia Celular e Molecular.
A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora, bem como ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.



Curitiba, 26 de Fevereiro de 2015


Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro
Coord. do Programa de Pós-Graduação
Em Biologia Celular e Molecular
Matr./UFPR 104132

CENTRO POLITÉCNICO - CEP 81.531-990-JARDIM DAS AMÉRICAS-Caixa Postal 19031-
FONE: (41) 3361-1676 FAX 3266-2042 - E-Mail- pgbiocel@ufpr.br - www.pgbiocel.ufpr.br CURITIBA -PR

À você minha pequena...

Ah ... como era a vida antes de você chegar, mesmo?

Era muito mais sem graça com certeza ...

Você chegou e junto com você um turbilhão de novidades e no meio disso tudo uma tese para ser defendida... Mas com a sua inocência, entendeu minhas ausências, me fez tirar forças da onde eu não sabia para tocar meu trabalho a diante e terminar a tese. A Mama ama você mais que tudo Anjinha !!!! Esse trabalho é dedicado à você minha princesa !!!

Obrigada por fazer parte desta etapa da minha vida gatinha !!!!

**Ao meu Moção ... Meu marido ... Meu melhor amigo... Meu companheiro para o
que der e vier ... E agora papaizote da nossa Anjinha...
Obrigada por me apoiar sempre !!!! Me dar forças, broncas, conselhos, de tudo
um pouco.... Obrigada por fazer a nossa bebezotinha entender a ausência da
mama, quando várias noites você tinha que fazer ela dormir para eu poder ir no
lab ou ficar escrevendo... Sem você eu não conseguiria vitinha !!! Obrigada
por estar aqui ... Sempre !!!! Tannnnnnntooooooooo !!!!!**

À vocês pentelhos...

O que seria de mim sem vocês ...

Vocês são minha fortaleza, meu porto seguro, sempre posso contar com vocês pra tudo, tudo mesmo !!!!! Obrigada pelos conselhos, pelas broncas, por nunca me deixar desistir, mesmo nos momentos mais difíceis vocês sempre tinham uma palavra que me confortava, me encorajava e me fazia seguir em frente. Sem a ajuda de vocês esse trabalho não ficaria pronto nunca !!!!

Amo vocês !!!!!!!

AGRADECIMENTOS

À Deus, em primeiro lugar, por me dar saúde, vitalidade e ânimo sempre !!!
E por sempre estar comigo.

Ao Dr. Stenio Perdigão Fragoso, pela orientação, confiança, dedicação e amizade. Afinal, são 12 anos hein chefe... Como você ainda me aguenta? Obrigada por tudo, aprendi e continuo aprendendo muito com você !!!

À Dra Tatiana Arruda Campos Brasil, que me ajudou desde o primeiro momento em que eu entrei no Laboratório de Proteínas com seu jeito meigo e atencioso e com sua experiência me mostrou um mundo novo por qual eu me apaixonei. Sempre com muita paciência me explicava tudo tim tim por tim tim e me ajudou muuuito na escrita da tese. Obrigada Tati !!!

À Dra Lia Medeiros, que me ajudou muito com as microscopias. Fizemos até o sacrifício de ir visualizar uma MET na UFSC em Floripa, que chato, né ... Brigadão Lia pela paciência e boa vontade !!!

Ao Dr. Paulo Carvalho e a Dra Juliane Fischer que me ajudaram em experimentos e análises que nem entraram na tese. Sempre muito atenciosos. Obrigada !!

Aos meus queridos amigos do LAB2: Aqueles que já se foram (André, Aleatório, Lari, Maurício, Bárbara, Odinéia, Pá) e aqueles que estão lá até hoje (Didi, Gi, Vanessa, Felipe, Aline, Claudinha). Obrigada por fazerem o trabalho ficar mais divertido. Aos meus companheiros de doc, Mônica e Fernando, o trio parada dura passou por muita coisa junto e tem muita história pra contar !!! Obrigada gente, adoro vocês !!!

Às minhas queridas amigas mais “experientes” que moram no meu coração, Aldinha e Dani obrigada por todos os momentos que passamos juntas, no lab e fora do lab, obrigada pela ajuda que sempre me deram, sem esperar nada em troca,

vocês sabem que seus conselhos sempre foram muito valiosos pra mim. Obrigada amigas, vocês são ímpares !!!

À minha querida irmãzinha Rô, que nasceu no mesmo dia... só que é mais velha !!! hahahahaha Obrigada amiga por tudo, por todo esse tempo, pelos experimentos, pelas confissões, pelas gargalhadas. Você é única !!!

À Pri Hira, Mari Serpeloni, Haruo, Daisy, Vanessa que sempre me ajudavam quando eu precisava ou fazer um experimento ou jogar conversa fora !!!

Aos meus amigos doutores atleticanos Michel e Henrique, que me ajudaram em vários experimentos e análises. Obrigada por estarem sempre dispostos em ajudar. Vocês são atleticanos mas são gente boa. Obrigada !!

Ao Giovany pela imensa ajuda com os camundongos, sempre disposto em ajudar e ensinar !!!

Ao Nilson, Silvio, Tânia, Sibelli por toda a ajuda, pela amizade e pela paciência e competência. Ah e pelas histórias de terror ...

À Maria Cristina por toda a ajuda, não só na parte administrativa e pela amizade.

Ao Dr. Marco Krieger, pela confiança e por me proporcionar suporte financeiro quando entrei no período de prorrogação.

A todos os amigos e pesquisadores do Instituto Carlos Chagas dos demais laboratórios, Lab REG , Lab Genômica, Laboratório de Biologia Celular por terem, de um jeito ou de outro, participado do processo. É difícil agradecer todo mundo... Valeu galera !!!!

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

(Isaac Newton)

RESUMO

O DNA do cinetoplasto (kDNA) dos tripanosomatídeos consiste numa rede de moléculas circulares catenadas entre si: os minicírculos e os maxicírculos. Os minicírculos codificam RNAs guias (gRNAs) e os maxicírculos codificam para algumas subunidades de enzimas mitocondriais e rRNA, em um padrão criptografado (edição de RNA). Estudos com o tripanosomatídeo *Crithidia fasciculata* mostraram que proteínas do tipo histona H1 associadas ao cinetoplasto (KAPs) são capazes de condensar a rede de kDNA. Porém, pouco é conhecido sobre estas proteínas de *Trypanosoma cruzi*, um protozoário parasita que sofre alterações na estrutura do DNA do cinetoplasto ao longo de seu ciclo de vida. Neste trabalho foi caracterizada uma proteína associada ao cinetoplasto de *T. cruzi*, denominada de TcKAP7, que possui baixo peso molecular e natureza básica, condizente com um papel na neutralização de carga e na condensação do DNA. Através de ensaios usando a técnica de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) foi possível perceber que a proteína TcKAP7 sofre mudanças estruturais na presença do kDNA, sugerindo uma interação com essa estrutura, seja através de ligações eletrostáticas ou através de ligações específicas com moléculas presentes na rede. A análise pela técnica de imunofluorescência mostrou que proteína TcKAP7 está localizada na região dos pólos do cinetoplasto, o que sugere que pode estar envolvida na finalização da replicação dos minicírculos. Mutante nulo para TcKAP7 foi gerado por técnicas de substituição gênica, a fim de verificar se na ausência de TcKAP7 ocorriam alterações na estrutura do kDNA. Contudo, os parasitas mutantes para TcKAP7 não apresentavam alterações na estrutura e morfologia do cinetoplasto, quando analisados por microscopia eletrônica e foram capazes de se diferenciar, sem perder a capacidade infectiva. Entretanto, ensaios de RNA de interferência visando analisar a função do gene *TbKAP7*, ortólogo em *T. brucei*, levou à redução da proliferação celular das formas procíclicas desse parasita, mostrando que este gene é essencial para o metabolismo desse tripanosomatídeo, sugerindo que KAP7 possa ter papéis distintos em *T. cruzi* e *T. brucei*.

Palavras-chaves: *Trypanosoma cruzi*, cinetoplasto, nocaute, KAPs.

ABSTRACT

The kinetoplast DNA (kDNA) of trypanosomatids consists in a network of circular molecules catenated each other, the minicircles and maxicircles . The minicircles code RNAs guides (gRNAs) and the maxicircles code for some subunits of mitochondrial enzymes and rRNA in a cryptic pattern (RNA editing). Studies in the trypanosomatid protozoan *Crithidia fasciculata* showed that the kDNA is associated with histone H1-like proteins, known as kinetoplast-associated proteins (KAPs), which are capable of condensing the kDNA network. However, little is known about these proteins of *Trypanosoma cruzi*, a protozoan parasite which undergoes changes in kinetoplast DNA structure over its life cycle. Here we characterize a protein associated with *T. cruzi* kinetoplast, named TcKAP7. TcKAP7 is a low molecular weight protein with basic nature, which is consistent with a role in DNA charge neutralization and condensation. Analysis by small angle X-Ray scattering technique (SAXS) revealed that the TcKAP7 protein undergoes structural changes in the presence kDNA, suggesting an interaction with this DNA network, either through electrostatic bonds or through specific binding to molecules present on the network. The immunofluorescence analysis showed that TcKAP7 is located in the kinetoplast poles, suggesting that TcKAP7 might be involved in the late stages of the minicircle replication. A null mutant for TcKAP7 was obtained by gene replacement techniques to study possible alterations in the kDNA structure. However, no modification in the structure and morphology of the kinetoplast was observed by electron microscopy. In addition, *Tckap7* null mutant was able to differentiate without losing its infective capacity. Interference RNA assays were performed to analyze the function of *TbKAP7*, the ortholog gene in *T. brucei*. The ablation of *TbKAP7* expression led to reduction in the procyclic proliferation, suggesting that this gene is essential for the metabolism of the parasite and might play distinct roles in *T. cruzi* and *T. brucei*.

Key-words: *Trypanosoma cruzi*, kinetoplast, gene knockout, KAPs.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1:	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA DOENÇA DE CHAGAS.....	19
FIGURA 2:	CICLO DE TRANSMISSÃO DO <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
FIGURA 3:	ESQUEMA GERAL DAS PRINCIPAIS ESTRUTURAS CELULARES DE <i>T. cruzi</i>	22
FIGURA 4:	REDE DE kDNA.....	27
FIGURA 5:	DIFERENTES ARRANJOS DO CINETOPLASTO DE <i>T. cruzi</i>	29
FIGURA 6:	MUDANÇAS NA POSIÇÃO DO KDNA NOS TRYPANOSOMAS.....	29
FIGURA 7:	REPOSICIONAMENTO DO KDNA EM RELAÇÃO ÀS OUTRAS ORGANELAS DURANTE O CICLO DE VIDA DE UM FLAGELADO.....	30
FIGURA 8:	REPLICAÇÃO DO kDNA.....	32
FIGURA 9:	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MICROFLUIDIFICADOR.....	45
FIGURA 10:	VETOR PARA EXPRESSÃO EM <i>T. CRUZI</i> P3XFLAG.	50
FIGURA 11:	ESQUEMA DA CONSTRUÇÃO DOS VETORES UTILIZADOS PARA O NOCAUTE DO GENE <i>TcKAP7</i>	55
FIGURA 12:	MAPA DO VETOR P2T7-177 UTILIZADO PARA ENSAIOS DE RNAi.....	62
FIGURA 13:	COMPARAÇÃO ENTRE AS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DEDUZIDAS DO GENE <i>KAP7</i> DE <i>T. cruzi</i> Dm28C E DOS HAPLÓTIPOS DE CL BRENER.....	65
FIGURA 14:	COMPARAÇÃO ENTRE AS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DEDUZIDAS DO GENE <i>KAP7</i> EM DIFERENTES TRIPANOSOMATÍDEOS.....	66
FIGURA 15:	SINTENIA DE <i>TcKAP7</i> COM OUTROS TRIPANOSOMATÍDEOS.....	67
FIGURA 16:	CARACTERIZAÇÃO DA REGIÃO 5'-UTR DO TRANSCRITO <i>TcKAP7</i>	69
FIGURA 17:	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA DE FUSÃO TCKAP7-FLAG EM FORMAS EPIMASTIGOTAS DE <i>T. CRUZI</i>	70
FIGURA 18:	IMUNOLOCALIZAÇÃO DE TcKAP7 EM EPIMASTIGOTAS DE <i>T. CRUZI</i>	71
FIGURA 19:	ENSAIOS DE PCR UTILIZANDO DNA DE <i>T. cruzi</i> <i>kap7/kap7</i> (WT) E <i>T. cruzi</i> <i>kap7::neo/kap7::higro</i> (NO) COM DIFERENTES PRIMERS.....	73
FIGURA 20:	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS SÍTIOS DA ENZIMA <i>HindIII</i> NO LOCUS DO GENE <i>KAP7</i> DE <i>T. cruzi</i> CL Brener.....	75

FIGURA 21:	ANÁLISE DA ORGANIZAÇÃO DOS GENES <i>TCKAP7</i> , <i>NEO</i> E <i>HIGRO</i> POR ENSAIO DO TIPO SOUTHERN BLOT.....	75
FIGURA 22:	COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE <i>TcKAP7</i> POR WESTERN BLOT.....	76
FIGURA 23:	COLORAÇÃO PELO MÉTODO PANÓTICO RÁPIDO DOS PARASITAS EPIMASTIGOTAS NOCAUTEADOS.....	77
FIGURA 24:	COMPARAÇÃO ENTRE A ULTRAESTRUTURA DO CINETOPLÁSTO DO <i>T. cruzi</i> DM28C TIPO SELVAGEM (A) E DO MUTANTE DE <i>T. cruzi</i> PARA <i>TcKAP7</i> (B) POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	78
FIGURA 25:	CURVA DE CRESCIMENTO DO MUTANTE DE <i>T. cruzi</i> PARA <i>TcKAP7</i> (KO) E DO <i>T. cruzi</i> Dm28c SELVAGEM (WT)	79
FIGURA 26:	METACICLOGÊNESE <i>IN VITRO</i> DE <i>T. cruzi</i> Dm28c TIPO SELVAGEM E <i>T. cruzi</i> NOCAUTEADO.....	80
FIGURA 27:	RNAi DE <i>TbKAP7</i> INIBE O CRESCIMENTO DAS FORMAS PROCÍCLICAS DE <i>T. brucei</i>	82
FIGURA 28:	PURIFICAÇÃO DE <i>TCKAP7</i> ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE.....	83
FIGURA 29:	PURIFICAÇÃO DE <i>TCKAP7</i> ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA.....	84
FIGURA 30:	ANÁLISE POR DLS DE <i>TCKAP7</i>	85
FIGURA 31:	ENVELOPE MOLECULAR DE SAXS.....	86
FIGURA 32:	ESPECTRO DE DICROÍSMO CIRCULAR DE <i>TcKAP7</i>	87
FIGURA 33:	PREDIÇÃO DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA DE <i>TcKAP7</i>	87
FIGURA 34:	CRISTAL DE <i>TcKAP7</i> DE <i>T. CRUZI</i>	88
FIGURA 35:	ESTRUTURA DE <i>TcKAP7</i>	90
FIGURA 36:	SUPERFÍCIE ELETROSTÁTICA DE <i>TcKAP7</i>	91
FIGURA 37:	ALINHAMENTO ESTRUTURAL DE 3TQ6, 4NOD, 3TTM, 4NNU E <i>TCKAP7</i>	93
FIGURA 38:	ESPECTRO DE DICROÍSMO CIRCULAR DE <i>TcKAP7</i>	94
FIGURA 39:	ENVELOPE MOLECULAR DE <i>TcKAP7</i>	95
FIGURA 40:	ENVELOPE MOLECULAR DE <i>TcKAP7</i> VISTO EM DIFERENTES ÂNGULOS.....	96

LISTA DE TABELAS

TABELA 1:	RELAÇÃO DOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS PARA A CLONAGEM DA REGIÃO UPSTREAM DE <i>TcKAP7</i> NO VETOR pNEO1.....	53
TABELA 2:	RELAÇÃO DOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS PARA A CLONAGEM DA REGIÃO DOWNSTREAM DE <i>TcKAP7</i> NO VETOR pNEO1.....	53
TABELA 3:	RELAÇÃO DOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>TbKAP7</i>	63
TABELA 4:–	PERCENTUAL DE IDENTIDADE ENTRE AS PROTEÍNAS KAP7 NOS TRIPANOSSOMATÍDEOS COM O GENOMA SEQUENCIADO.....	67
TABELA 5:	COMBINAÇÕES DE <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS NA PCR PARA CONFIRMAR O NOCAUTE DE <i>TcKAP7</i>	72

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1 O <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
1.2 Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	20
1.3 Aspectos celulares de <i>T. cruzi</i>	21
1.4 O genoma de <i>T. cruzi</i>	24
1.5 Expressão gênica de <i>T. cruzi</i>	25
1.6 O cinetoplasto.....	26
1.7 A rede de kDNA.....	26
1.7.1 Replicação do kDNA.....	31
1.8 Proteínas associadas ao cinetoplasto (KAPs).....	32
2. OBJETIVOS.....	35
2.1 OBJETIVO GERAL.....	35
2.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
3.1 Reagentes e Soluções Utilizados.....	36
3.1.1 Reagentes.....	36
3.1.2 Tampões e Soluções.....	36
3.1.3 Meios de cultura.....	38
3.2 Cultivo do <i>Trypanosoma cruzi</i>	38
3.2.1 Epimastigotas.....	38
3.2.2 Tripomastigotas metacíclicos.....	39
3.3 Curva de crescimento de <i>T. cruzi</i>	39
3.4 Obtenção de DNA de <i>T. cruzi</i>	40
3.5 Obtenção de kDNA de <i>T. cruzi</i>	40
3.6 Obtenção de extrato proteico de <i>T. cruzi</i>	40
3.7 Clonagem do gene <i>TcKAP7</i>	41
3.8 Obtenção do cDNA de <i>TcKAP7</i> através de ensaio de RT-PCR.....	41
3.9 Seleção dos clones recombinantes.....	42
3.9.1 Técnica de palitagem (toothpick).....	42
3.9.2 Técnica de PCR de colônia.....	43
3.10 Preparação de plasmídeo em pequena escala (miniprep).....	43
3.11 Expressão da proteína <i>TcKAP7</i> em <i>E. coli</i>	43
3.12 Purificação da proteína recombinante <i>TcKAP7</i>	44
3.12.1 Processamento da amostra.....	44
3.12.2 Cromatografia de afinidade.....	45
3.12.3 Cromatografia de troca iônica.....	46
3.12.4 Cromatografia de gel filtração.....	46
3.13 Espalhamento Dinâmico de Luz – DLS.....	46
3.14 Espectroscopia de dicroísmo circular (CD).....	46
3.15 Quantificação e concentração.....	47
3.16 Ensaios de Cristalização.....	47
3.17 Espalhamento de raio-X a baixo ângulo (SAXS).....	48
3.18 Modelagem de <i>TcKAP7</i>	48
3.19 Obtenção de antissoro policlonal contra <i>TcKAP7</i>	49
3.20 Análise da expressão do gene <i>TcKAP7</i> e de seu mutante por ensaio tipo <i>western blot</i>	49
3.21 Superexpressão de <i>TcKAP7</i>	50

3.21.1 Amplificação e clonagem do gene <i>TcKAP7</i> no vetor pNEO3xFlag para superexpressão da proteína.....	50
3.21.2 Transfecção por eletroporação.....	52
3.21.3 Seleção dos transfectantes.....	52
3.22 Deleção do gene <i>TcKAP7</i> por nocaute gênico.....	53
3.22.1 Amplificação e clonagem das regiões a montante e a jusante do gene <i>TcKAP7</i>	53
3.22.2 Amplificação dos cassetes UPS-NEO-DOWN e UPS-HIGRO-DOWN para transfecção de <i>T. cruzi</i>	55
3.22.3 Transfecção do <i>T. cruzi</i> com o cassete UPS-NEO-DOWN.....	56
3.22.4 Extração de DNA dos transfectantes.....	57
3.22.5 Análise por PCR do DNA dos parasitas transfectados com o cassete UPS-NEO-DOWN.....	57
3.22.6 Transfecção do <i>T. cruzi</i> com o cassete UPS-HIGRO-DOWN.....	57
3.22.7 Análise por PCR do DNA dos parasitas transfectados com o cassete UPS-HIGRO-DOWN.....	58
3.22.8 Análise da organização do gene <i>TcKAP7</i> e da eficiência de seu nocaute através de ensaio do tipo <i>Southern blot</i>	58
3.23 Localização celular da proteína TcKAP7 através de ensaio de imunofluorescência.....	59
3.24 Análise da ultraestrutura do cinetoplasto do mutante de <i>T. cruzi</i> para <i>TcKAP7</i> por microscopia eletrônica de transmissão.....	60
3.25 Coloração dos parasitas transfectados.....	60
3.26 Infecção de células Vero com o mutante de <i>T. cruzi</i> para <i>TcKAP7</i>	61
3.27 Análise da função do gene <i>TbKAP7</i> de <i>Trypanosoma brucei</i> através de ensaios de RNA de interferência.....	61
3.27.1 Indução do RNA dupla fita.....	64
4. RESULTADOS.....	65
4.1 Clonagem e caracterização do gene <i>TcKAP7</i>	65
4.2 Expressão da proteína TcKAP7 em <i>T. cruzi</i>	69
4.3 Localização celular de TcKAP7 através de ensaio de imunofluorescência.....	70
4.4 Deleção do gene <i>TcKAP7</i> por nocaute gênico.....	71
4.4.1 Análise por PCR do DNA dos parasitas transfectados com os cassetes UPS-NEO-DOWN e UPS-HIGRO-DOWN.....	72
4.4.2 Análise da organização dos genes <i>TcKAP7</i> , <i>neo</i> e <i>higro</i> por ensaio do tipo <i>Southern blot</i>	74
4.5 Comparação da expressão do gene <i>TcKAP7</i> por western blot.....	76
4.6 Análise da morfologia e da ultraestrutura do cinetoplasto do mutante de <i>T. cruzi</i> para <i>TcKAP7</i>	76
4.7 Multiplicação, diferenciação e infectividade do mutante de <i>T. cruzi</i> para <i>TcKAP7</i>	79
4.8 Análise da função do gene <i>KAP7</i> de <i>Trypanosoma brucei</i> através de ensaios de RNA de interferência.....	80
4.9 Caracterização estrutural de TcKAP7.....	82
4.9.1 Produção recombinante de TcKAP7.....	82
4.10 Análise do estado oligomérico de TcKAP7.....	84
4.11 Análise do conteúdo de estrutura secundária de TcKAP7 recombinante.....	86
4.12 Análise estrutural de TcKAP7.....	87

4.13 Investigação de possíveis funcionalidades baseadas na estrutura de TcKAP7.....	91
4.13.1 Predição de função paraTcKAP7.....	91
4.13.2 Análises preliminares da possível interação entre TcKAP7 e kDNA.....	93
5. DISCUSSÃO.....	97
6. CONCLUSÕES.....	102
7. REFERÊNCIAS.....	103

1. INTRODUÇÃO

1.1 O *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi é um protozoário flagelado unicelular pertencente ao reino Protista, subreino Protozoa, filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, classe Zoomastigophora, ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae (LEVINE *et al.*, 1980). A principal característica dessa ordem é a presença de uma estrutura singular, o cinetoplasto, que abriga em uma massa de DNA extranuclear concentrado na mitocôndria única deste protista (SHAPIRO & ENGLUND, 1995). A família Trypanosomatidae inclui os seguintes gêneros importantes: *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Endotrypanum*, *Herpetomonas*, *Leishmania*, *Leptomonas*, *Phytomonas* e *Trypanosoma*. O gênero *Trypanosoma* é um dos mais importantes dentro da família Trypanosomatidae por incluir uma série de espécies causadoras de doenças humanas importantes como o *Trypanosoma cruzi*, agente da doença de Chagas; *Trypanosoma rhodesiense* e *Trypanosoma gambiense*, agentes da doença do sono; e de animais o *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma equiperdum* e *Trypanosoma equinum* (DE SOUZA, 2015).

Este protozoário é um microrganismo heteroxênico, com ciclo biológico alternado entre hospedeiros vertebrados (mamíferos) e invertebrados (triatomíneos). Existem diferentes formas de transmissão da doença, dentre as quais se destaca a via vetorial que consiste na transmissão do parasita através de excretas do inseto vetor hematófago pertencente à ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae (DIAS *et al.*, 1956). A principal característica biológica dos triatomíneos é que são obrigatoriamente hematófagos e necessitam do repasto sanguíneo para completar o desenvolvimento (DIAS, 2000). O parasita pode ainda ser transmitido aos mamíferos por transfusão sanguínea ou via oral e, com menos frequência, por via congênita, acidentes de laboratório e transplantes de órgãos (BELTRAO HDE *et al.*, 2009; STEINDEL *et al.*, 2008; TANOWITZ *et al.*, 1992). Praticamente todo tipo de célula nucleada do hospedeiro mamífero pode ser parasitada considerando o tropismo das diferentes cepas (LENZI *et al.*, 1996). Outra característica deste parasita é apresentar diferentes morfologias durante o ciclo biológico. A classificação

1.2 Ciclo de vida do *T. cruzi*

O *T. cruzi* apresenta um ciclo complexo na natureza, sofrendo mudanças estruturais, bioquímicas e morfológicas, de acordo com o ambiente em que se encontra. Formas replicativas epimastigotas e amastigotas dos hospedeiros invertebrado e mamífero, respectivamente, alternam-se com as formas infectivas e não proliferativas tripomastigotas metacíclicas (proveniente do inseto vetor) e tripomastigota sanguínea (originária do mamífero infectado) (FIGURA 2) (DE SOUZA, 1984).

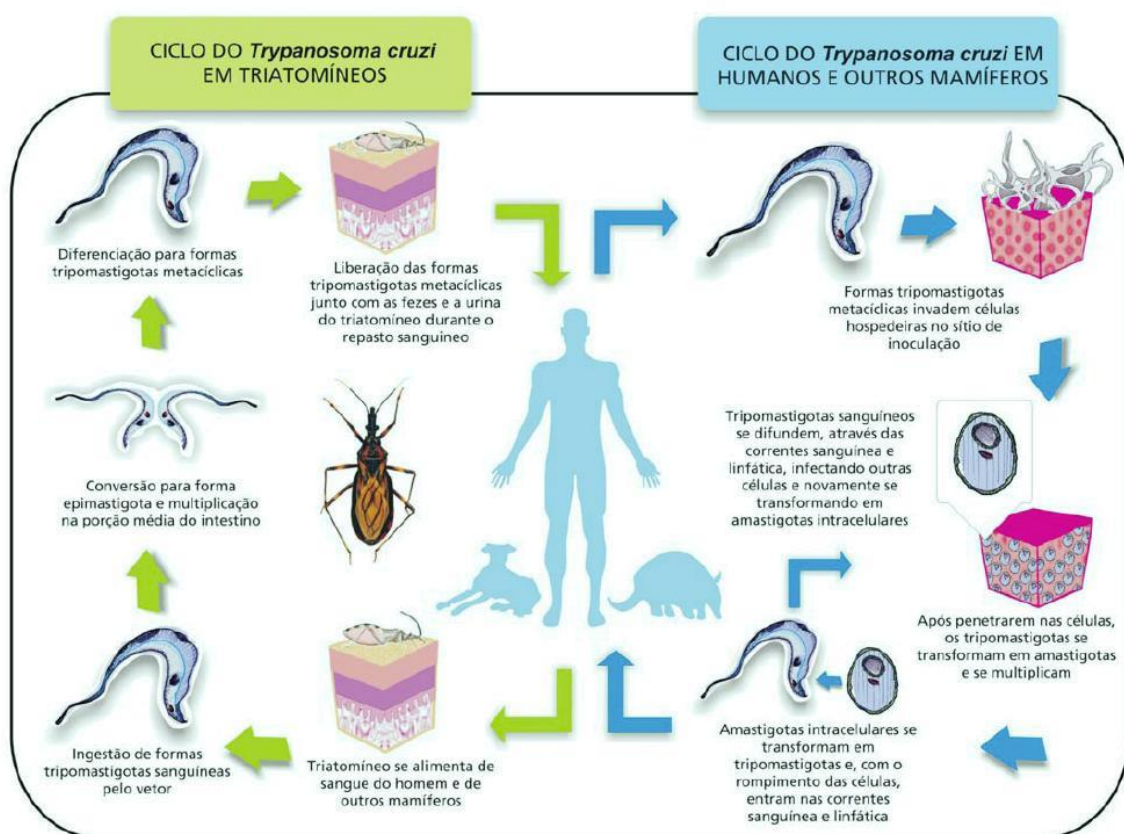


FIGURA 2: CICLO DE TRANSMISSÃO DO *Trypanosoma cruzi*
 FONTE: Infográfico: Venício Ribeiro, ICICT/FIOCRUZ.

Durante o repasto sanguíneo do inseto vetor, formas tripomastigotas metacíclicas atingem a corrente sanguínea do hospedeiro pela lesão da picada. Esta forma infectiva é capaz de invadir todos os tipos de células, com exceção das

hemácias. Após a entrada do parasita na célula, os tripomastigotas diferenciam-se em uma forma replicativa denominada amastigota que, após diversas divisões, sofre uma diferenciação para um estágio intermediário, o epimastigota intracelular e, posteriormente, para tripomastigota. Quando ocorre a lise celular, os tripomastigotas são liberados ao meio extracelular, podendo então invadir células vizinhas, atingir novos tecidos através da corrente sanguínea ou ainda infectar um inseto vetor durante o processo de hematofagia, recomeçando o ciclo no hospedeiro invertebrado. No inseto, as formas tripomastigotas diferenciam-se em epimastigotas no tubo digestivo e migram para o intestino onde ocorrem as divisões binárias. Ao atingirem a porção terminal do tubo digestivo, ocorre a diferenciação em tripomastigotas metacíclicos que são eliminados juntamente com as fezes e urina do triatomídeo.

A transformação da forma epimastigota do *T. cruzi* em tripomastigota metacíclica, denominada metaciclogênese, é de grande interesse de estudo, pois neste processo ocorrem diversas alterações morfológicas, metabólicas e de expressão gênica (GOLDENBERG *et al.*, 1985). A metaciclogênese, que ocorre naturalmente no intestino do inseto vetor, pode ser mimetizada *in vitro* utilizando-se meio quimicamente definido que simula as condições da urina do inseto vetor (CONTRERAS *et al.*, 1985).

1.3 Aspectos celulares de *T. cruzi*

O *Trypanosoma cruzi*, apresenta, além das organelas típicas da maioria das células eucarióticas, como núcleo, retículo endoplasmático, aparato de Golgi e mitocôndria, algumas estruturas peculiares (FIGURA 3), como os microtúbulos subpeliculares, a estrutura paraflagelar, os reservossomos, o cinetoplasto, os glicossomos e os acidocalcisomos, exclusivos dos tripanosomatídeos (revisto por DE SOUZA, 1984, 1999, 2002).

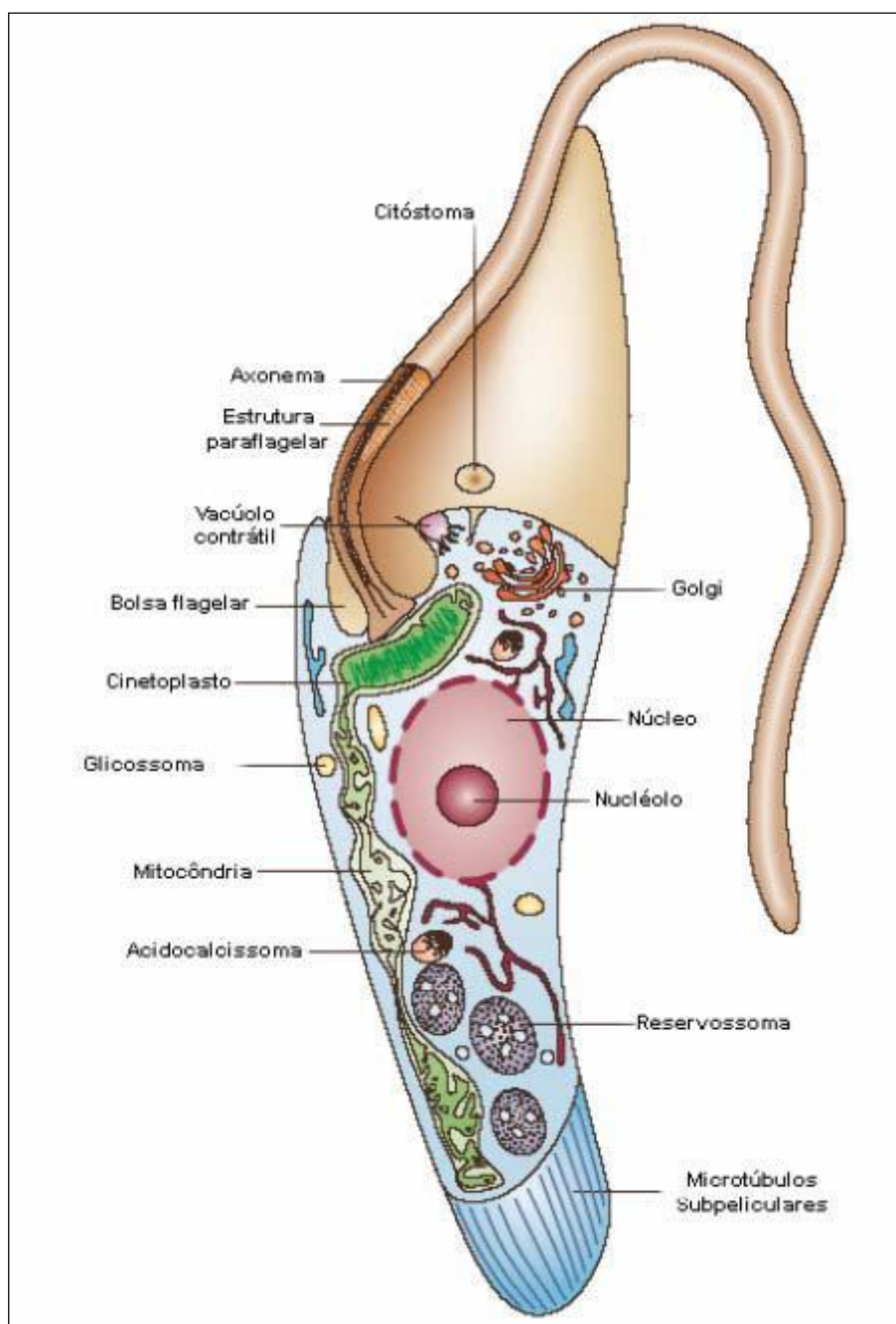


FIGURA 3: ESQUEMA GERAL DAS PRINCIPAIS ESTRUTURAS CELULARES DE *T. cruzi*.
 FONTE: DOCAMPO *et al.*, 1975.

A superfície celular dos tripanossomatídeos é composta, principalmente, pela membrana plasmática e pelos microtúbulos subpeliculares. Pequenos filamentos conectam fortemente os microtúbulos subpeliculares, os quais se apresentam espaçados de forma regular, entre si e com a membrana plasmática (DE

SOUZA; SANT'ANNA; CUNHA-E-SILVA, 2009), conferindo rigidez à célula e resistência ao rompimento mecânico.

Todos os membros da família Trypanosomatidae apresentam um flagelo, que emerge de uma área de invaginação da membrana plasmática conhecida como bolsa flagelar. Devido à localização específica de vários receptores nesta área, acredita-se que a maior parte do tráfego vesicular e entrada de nutrientes ocorram nesta região. Outra invaginação menor, localizada próxima à bolsa flagelar, o citóstomo, também está envolvida com a absorção de nutrientes (PORTO-CARREIRO *et al.*, 2000).

O flagelo do *T. cruzi* apresenta uma estrutura básica semelhante a outros flagelos, sendo envolvido por uma membrana flagelar e contendo um axonema típico, que apresenta um padrão de nove pares de microtúbulos periféricos e um par central. Associado ao flagelo deste parasita é encontrado um complexo arranjo de filamentos protéicos, denominado de estrutura paraflagelar (revisto por GULL, 1999).

Na parte posterior da célula, existem organelas usualmente esféricas denominadas reservossomos. Os reservossomos são organelas ácidas que possuem em seu interior proteinases principalmente a cruzipaina (uma cisteíno-proteinase) e proteínas ingeridas, que chegam dentro de vesículas endocíticas, oriundas da bolsa flagelar e do citóstomo. Com base nisso foi proposto que os reservossomos seriam compartimentos pré-lisossomais (SOARES *et al.*, 1992). Também tem sido proposta a participação dos reservossomos no processo de metaciclogênese, como principal fonte de energia para esta atividade (SOARES, 1999).

O *T. cruzi*, assim como todos os membros da família Trypanosomatidae, apresenta uma mitocôndria única e ramificada que se estende por todo o corpo do protozoário. Como em todas as células eucarióticas, a mitocôndria dos tripanosomatídeos também apresenta DNA mitocondrial, também conhecido como kDNA ou DNA do cinetoplasto, que se concentra em uma determinada região da mitocôndria localizada logo abaixo do corpúsculo basal, dando origem a uma estrutura intramitocondrial chamada de cinetoplasto. O cinetoplasto abriga o kDNA, o qual é constituído por moléculas circulares que se encontram interligadas formando uma extensa rede entre si (SHLOMAI, 1994).

Distribuídos pelo citoplasma estão os glicossomos, um tipo especializado de peroxissomo. Estes acumulam enzimas da via glicolítica, envolvidas na conversão

da glicose a 3-fosfoglicerato, que em outros organismos, localizam-se no citoplasma (HANNAERT *et al.*, 2003).

Outra particularidade dos tripanossomatídeos está na estocagem intracelular de cálcio. Este íon, importante nos processos de sinalização celular, é estocado em organelas denominadas acidocalcissomos. Os acidocalcissomos provavelmente estão envolvidos em diversos processos biológicos, tais como o armazenamento de cálcio e polifosfatos, adaptação dos tripanosomatídeos a condições de estresse ambiental, manutenção do pH intracelular e osmorregulação (revisto por DOCAMPO *et al.*, 2005).

1.4 O genoma de *T. cruzi*

No ano de 2005 foi concluída a montagem do genoma do *T. cruzi* (EL-SAYED *et al.*, 2005). A cepa CL Brener foi a escolhida para o sequenciamento por ser bem caracterizada bioquímica e parasitologicamente (ZINGALES *et al.*, 1997) e por ser considerada representativa para o universo de cepas circulantes de *T. cruzi*. Com base na montagem do sequenciamento, o genoma diplóide do parasita foi calculado como sendo de 106,4 110,7 Mb, com cada haplótipo contendo cerca de 12.000 genes, sendo que mais de 50% do genoma constituiu-se de sequências repetitivas compostas por famílias de proteínas de superfície, retrotransposons e elementos subteloméricos (EL-SAYED *et al.*, 2005).

A comparação das estruturas genômicas e proteínas preditas, obtidas a partir do sequenciamento, de *Trypanosoma cruzi* com as de *Leishmania major* e *Trypanosoma brucei* indica mais similaridade entre *T. cruzi* e *T. brucei*, uma grande conservação entre os respectivos proteomas (exceto para antígenos de superfície) e uma sintenia bastante conservada entre os três tripanosomatídeos, apesar da divergência há 200-500 milhões de anos atrás (BERRIMAN *et al.*, 2005; EL SAYED *et al.*, 2005; IVENS *et al.*, 2005).

Os tripanosomatídeos possuem, além do genoma nuclear, um grande genoma mitocondrial (kDNA), que tem sido extensivamente estudado, sendo único em estrutura, função e mecanismo de replicação. O kDNA é formado por milhares de moléculas circulares, topologicamente relaxadas e interligadas umas as outras. Este arranjo contém aproximadamente 20 - 30% do DNA total dos tripanosomatídeos e é composto por 2 tipos de moléculas circulares: os maxicírculos e os minicírculos. Os

maxicírculos apresentam um tamanho entre 22-37 kb e contém basicamente os genes codificadores de proteínas envolvidas na fosforilação oxidativa e RNA ribossômico. Os minicírculos, com um tamanho que varia de espécie para espécie (0,5 a 2,5 kb), contém os genes que codificam os RNAs guia envolvidos na editoração do RNA (STUART *et al.*, 1989; SHAPIRO & ENGLUND, 1995; MADISON-ANTENUCCI, *et al.*, 2002; SIMPSON *et al.*, 2003; ONN *et al.*, 2006; GLUENZ *et al.*, 2007).

1.5 Expressão gênica de *T.cruzi*

T. cruzi está sujeito às frequentes mudanças de ambientes decorrentes da passagem por diferentes hospedeiros durante seu ciclo de vida (temperatura, pH, quantidade de nutrientes, evasão do sistema imune), por esse motivo a expressão gênica deste parasita é regulada por diversos fatores. A adaptação rápida e eficiente a estas diferentes condições torna-se uma importante tarefa para o parasita.

Como os demais eucariotos, o *T. cruzi* apresenta três RNAs polimerases: a RNA polimerase I, transcreve os genes para RNAs ribossômicos; a RNA polimerase II, os genes que codificam proteínas e a RNA polimerase III, pequenos RNAs, como o tRNA (RNA de transferência). Nos tripanosomatídeos, promotores para as RNA polimerase I e III já foram identificados, porém ainda não foram identificados promotores para os genes transcritos pela RNA polimerase II, com exceção de um promotor associado ao gene do mini-exon (GILLINGER & BELLOFATTO, 2001; revisto por CAMPBELL *et al.*, 2003).

Os genes dos tripanosomatídeos estão organizados em unidades policistrônicas e não apresentam interrupções por íntrons, com exceção do gene da poli-A polimerase (MAIR *et al.*, 2000).

Uma vez que em *T. cruzi*, como nos demais eucariotos, somente mRNAs monocistrônicos são traduzidos, os precursores de mRNA policistrônicos devem ser processados até mRNAs individuais. Como característica desta família, os transcritos de mRNA são processados por mecanismos de trans-splicing (AGABIAN, 1990) e poliadenilação (LEBOWITZ *et al.*, 1993; MATTHEWS *et al.*, 1994; VANHAMME & PAYS, 1995).

No processo de trans-splicing, as unidades codificadoras são separadas e é adicionada na extremidade 5' uma sequência extremamente conservada, espécie-

específica, de 39 nucleotídeos, denominada seqüência líder (SL) ou miniéxon (McCARTHY-BURKE *et al.*, 1989; NILSEN, 1992; VANHAMME & PAYS, 1995). Nesta reação, participam duas moléculas de RNA, uma doadora e outra aceptora. A doadora é um precursor do mini-exon, e, em *T. cruzi*, possui cerca de 110 nucleotídeos (ZWIERZYNSKI & BUCK, 1991). A aceptora é o transcrito derivado da unidade policistrônica ao qual o mini-exon é transferido. O complexo enzimático envolvido nesta reação é semelhante ao descrito para a de cis-splicing (LAIRD, 1989).

Os transcritos processados são estabilizados pela estrutura cap 4 do mini-exon (ULLU & TSCHUDI, 1991) e pela adição de uma cauda poli-A, à extremidade 3', sendo que a adição de ambos os elementos ocorrem em conjunto (LEBOWITZ *et al.*, 1993). Regiões ricas em resíduos de pirimidinas, além da seqüência consenso (AG) para o trans-splicing, regulam a adição do mini-exon e da cauda poli-A. Deleções nestas regiões impedem o correto processamento destes transcritos (MATTHEWS *et al.*, 1994).

A ocorrência de transcrição policistrônica, associada à ausência de promotores para RNA polimerase II e à presença de níveis distintos de mRNA originados de uma mesma unidade policistrônica, sugerem que a regulação da expressão gênica nesses protozoários ocorra a nível pós-transcricional, baseada, principalmente, em mecanismos que controlam a estabilidade e a tradução dos mRNAs (CLAYTON, 2002; BOUCHER *et al.*, 2002).

1.6 O cinetoplasto

O cinetoplasto é uma estrutura peculiar presente nos tripanosomatídeos e encontra-se inserida no interior da mitocôndria única, abrigando fibrilas de DNA, conhecidas como kDNA. O nome cinetoplasto (cineto=movimento e plasto=organela) foi dado, pois se acreditava que o mesmo fosse responsável pelo movimento do flagelo.

1.7 A rede de kDNA

O DNA do cinetoplasto é formado por dois tipos de moléculas circulares: os minicírculos, de tamanho entre 0,5 e 2,5 kb, e os maxicírculos, que apresentam entre 20 e 40 kb. Cerca de 10.000 minicírculos e 50 maxicírculos se encontram

catenados formando uma extensa rede (SHAPIRO & ENGLUND 1995, DE SOUZA & CAVALCANTI 2008) (FIGURA 4).

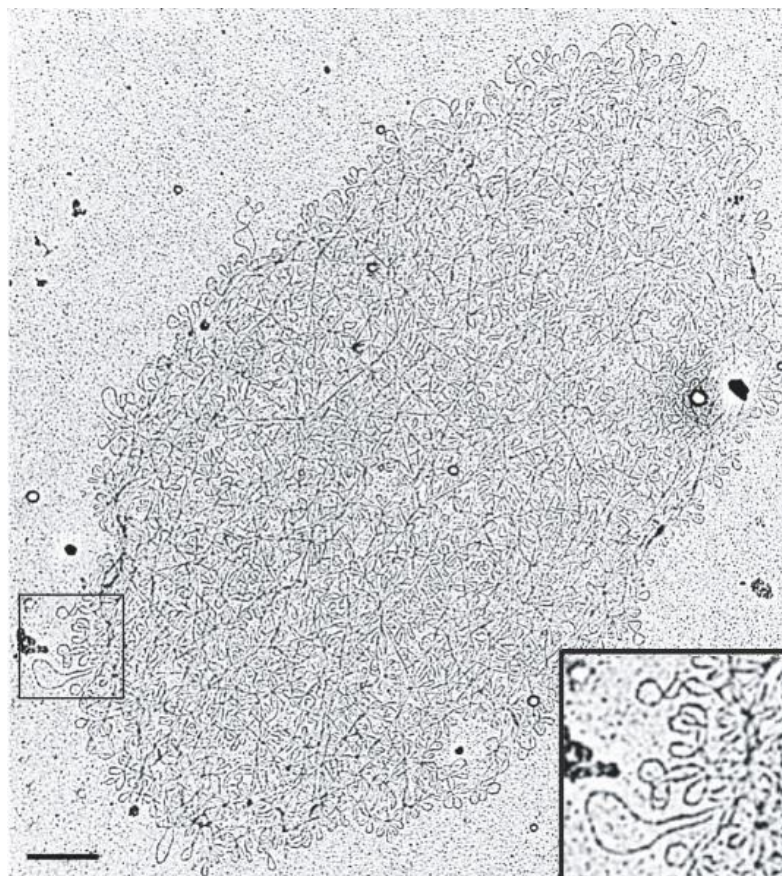


FIGURA 4: REDE DE kDNA
FONTE: ROY CHOWDHURY *et al.*, 2010

As primeiras questões relacionadas ao arranjo das moléculas na rede do kDNA dos tripanosomatídeos surgiram na década de 80, sugerindo que tal organização poderia ter evoluído como um maneira mais eficaz de armazenar uma grande quantidade de material em um pequeno espaço (HAJDUK *et al.*, 1986).

Os maxicírculos apresentam um tamanho de 22 a 37 kb e assim como o DNA mitocondrial de outros eucariotos, codificam RNAs ribossomais e diversas proteínas da cadeia respiratória, incluindo subunidades da citocromo oxidase e NADH desidrogenase (revisto por SHAPIRO & ENGLUND, 1995). Os transcritos dos maxicírculos são processados pós-transcricionalmente para formar mRNAs funcionais, através de um processo conhecido como edição ou editoração do RNA. A editoração do RNA consiste na inserção ou retirada de resíduos de uridina em

sítios específicos dos RNAs transcritos pelos maxicírculos, a fim de criar códons de iniciação ou terminação, mudanças na fase de leitura ou quadros abertos de leitura a partir de seqüências sem sentido. O processo de edição é especificado por pequenos RNAs guias, produzidos pelos minicírculos e maxicírculos, e catalisado por um complexo multiprotéico, o editosomo (revisto por Estévez & Simpson, 1999; Stuart *et al.*, 2005). Esse processo constitui uma forma de regular pós-transcricionalmente a expressão de genes mitocondriais nas diferentes formas evolutivas do parasita

Os minicírculos caracterizam-se por apresentar um tamanho de 0,5 a 2,5 kb e por transcrever os RNAs guia (gRNA), responsáveis pela especificidade da edição dos mRNAs codificados pelos maxicírculos, por meio de uma seqüência presente na porção central desses gRNAs (BENNE, 1994; STUART *et al.*, 2005). A significância da variação em tamanho e organização entre as espécies ainda não é aparente, contudo a diversidade das seqüências dos minicírculos está correlacionada com a necessidade de mais ou menos edição de mRNA, de cada organismo (STUART, 1991). Apesar desta diversidade, os minicírculos apresentam pelo menos duas regiões conservadas: o dodecâmero GGGGTTGGTGTA, conhecido como seqüência universal dos minicírculos (UMS) e o hexâmero ACGCCC, que correspondem à origem de replicação da fita L (*light*) e da fita H (*heavy*), respectivamente (BIRKENMEYER & RAY, 1986; BIRKENMEYER *et al.*, 1987; RAY, 1989; SHLOMAI, 1994; HINES & RAY, 2008).

Embora o cinetoplasto de todos os tripanosomatídeos seja formado por moléculas circulares relaxadas e catenadas, diferentes arranjos da rede de kDNA podem ser observados entre diferentes estágios do ciclo de vida desses protozoários, como em *T. cruzi* (FIGURA 5), assim como mudanças na posição do kDNA são utilizadas para identificar as diferentes formas evolutivas do parasita (FIGURA 6).

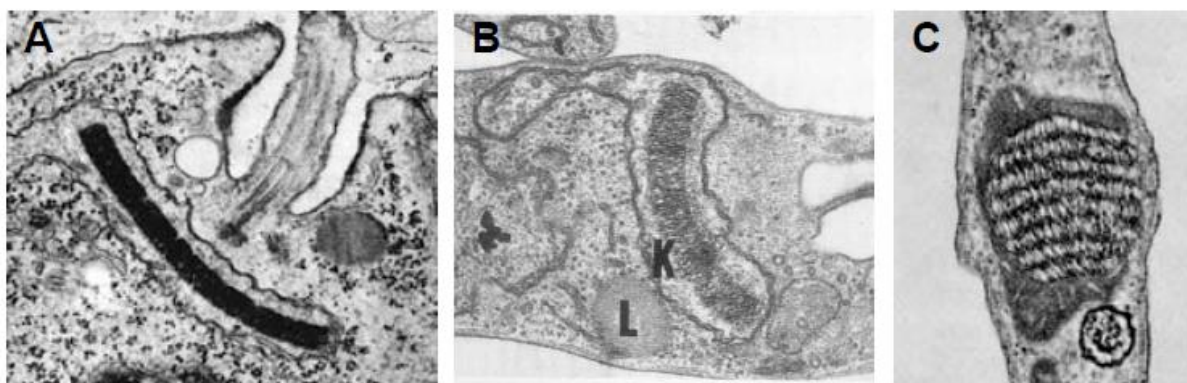


FIGURA 5 – DIFERENTES ARRANJOS DO CINETOPLASTO DE *T. cruzi*

LEGENDA: As fibrilas de kDNA se apresentam bastante compactadas em forma de bastão nas formas amastigotas (A) e epimastigotas (B), enquanto nas formas tripomastigotas a rede de kDNA torna-se menos compacta e a forma em bastão do cinetoplasto dá lugar a uma forma arredondada (C).

FONTE: DE SOUZA & SOUTO-PADRON, 1980 e DE SOUZA, 1984.

Nas formas amastigota (FIGURA 5A) e epimastigota (FIGURA 5B) de *T. cruzi*, as fibrilas de kDNA se apresentam bastante compactadas em forma de bastão. Em tripomastigotas (FIGURA 5C) de *T. cruzi*, a rede de kDNA torna-se menos compacta e a forma em bastão do cinetoplasto dá lugar a uma forma arredondada (DE SOUZA, 1984). Os vários graus de compactação do kDNA em tripanosomatídeos podem estar relacionados com a ação de proteínas que condensam o DNA, como será visto mais adiante.

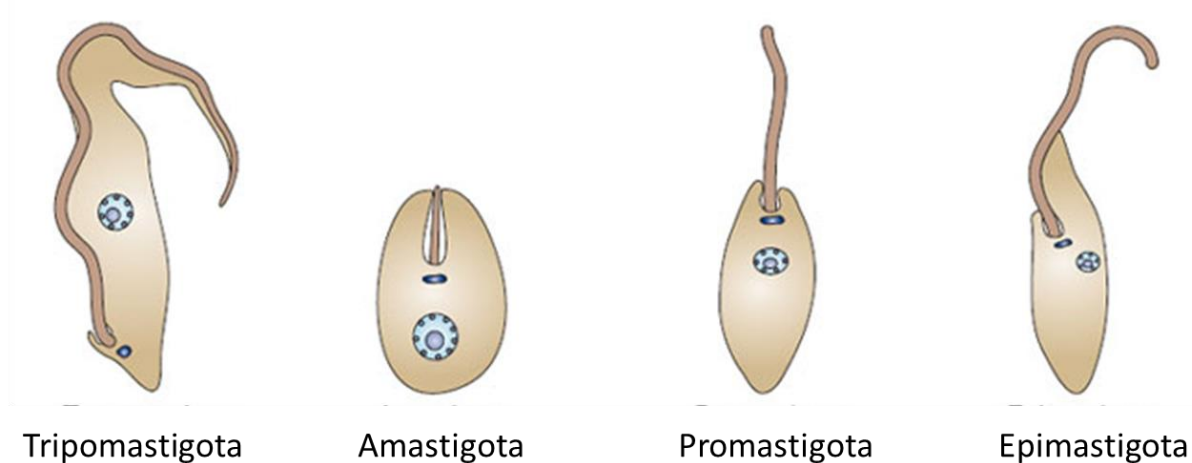


FIGURA 6: MUDANÇAS NA POSIÇÃO DO KDNA NOS TRYPANOSOMAS.

FONTE: Modificado de DO CAMPO *et al.*, 2005.

O cinetoplasto de todos os tripanosomatídeos encontra-se localizado próximo ao corpo basal, perpendicularmente ao eixo do flagelo. Em alguns tripanosomatídeos que sofrem diferenciação ao longo de seu ciclo de vida, como o *T. cruzi*, o cinetoplasto muda de posição dentro da célula, passando da região anterior (nos epimastigotas) para a região posterior (nos tripomastigotas), porém permanecendo próximo e perpendicular ao corpo basal (FIGURA 7). O cinetoplasto é fisicamente conectado ao corpo basal através de um grupo de filamentos citoplasmáticos, chamado de complexo de ligação tripartite (TAC) (OGBADOYI, *et al.* 2003). Este complexo é responsável pelo posicionamento espacial do cinetoplasto e por sua segregação.

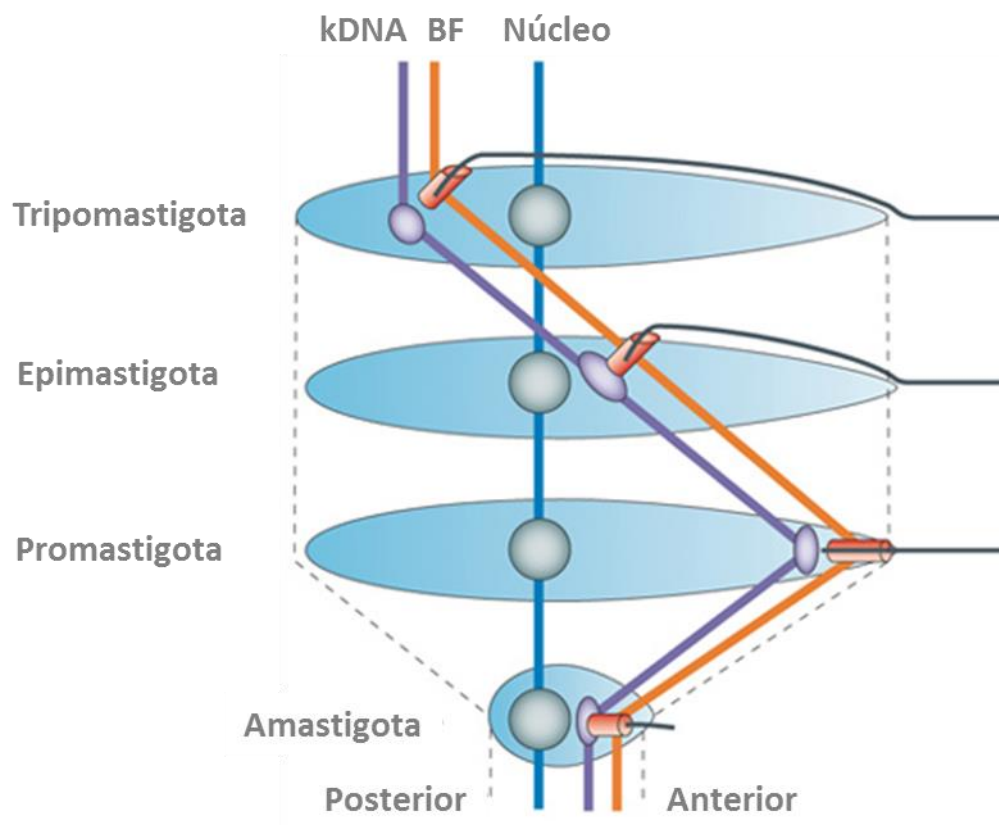


FIGURA 7: REPOSICIONAMENTO DO kDNA EM RELAÇÃO ÀS OUTRAS ORGANELAS DURANTE O CICLO DE VIDA DE UM FLAGELADO.

LEGENDA: A morfologia é definida pelas posições do ponto onde emerge o flagelo e a bolsa flagelar (BF) (mostrada em laranja), núcleo (mostrado em azul) e kDNA (mostrado em roxo).

FONTE: Modificado de FIELD & CARRINGTON, 2009.

1.7.1 Replicação do kDNA

Nos tripanosomatídeos a replicação do kDNA é restrita a fase S nuclear (COSGROVE & SKEEN, 1970; WOODWARD & GULL, 1990), diferente do que acontece na maioria dos eucariotos, onde a replicação do DNA mitocondrial ocorre ao longo do ciclo celular (LIU *et al.*, 2005).

A replicação dos minicírculos se inicia quando estes são individualmente decatenados da rede de kDNA pela ação de DNA topoisomerasas do tipo II, pois estes não se replicam enquanto estão ligados à rede, e termina quando os minicírculos retornam para a rede, com a ajuda da mesma enzima (SHAPIRO & ENGLUND, 1995).

Os minicírculos são liberados da rede em direção a zona cinetoflagelar (KFZ), uma região especializada da matriz mitocondrial entre o kDNA e o corpo basal (FIGURA 8) que abriga proteínas envolvidas com o início da replicação. Em seguida, os círculos migram (ou são transportados) para os pólos opostos da rede de kDNA, para completar sua replicação. O início da replicação dos minicírculos na região cinetoflagelar, envolve a montagem de um complexo protéico na origem de replicação dos círculos, com a participação da primase, polimerase e proteínas que se ligam à seqüência universal de minicírculos (UMSBP). Estas, juntamente com outras proteínas, geram uma forquilha de replicação que se propaga, unidirecionalmente, ao redor do minicírculo, formando uma estrutura tipo θ intermediária (LIU *et al.*, 2005; GLUENZ *et al.*, 2007).

Os minicírculos recém-replicados migram da zona KFZ para dois complexos protéicos situados nos pólos diametralmente opostos do cinetoplasto, onde os próximos passos de replicação irão ocorrer. Estes passos incluem: remoção dos primers pela ação de endonucleases, preenchimento de alguns intervalos entre os fragmentos de Okazaki pela DNA polimerase β e união dos cortes (nicks) por uma DNA ligase. Após estas etapas, os novos círculos sintetizados, que ainda possuem pelo menos uma interrupção em sua seqüência, são reunidos à periferia da rede pela ação de topoisomerasas II. Após todos minicírculos terem sido replicados, os intervalos são reparados (Revisto por LIU *et al.*, 2005, POVELONES, 2014).

Pouco se sabe sobre o processo de replicação dos maxicírculos. Assim como os minicírculos, os maxicírculos também sofrem replicação unidirecional, que

se inicia em uma origem contida na região variável da molécula, formando estruturas tipo- θ . Entretanto, ao contrário dos minicírculos, eles permanecem ligados à rede de kDNA durante o processo replicativo (revisto por KLINGBEIL *et al.*, 2001, Liu *et al.*, 2005).

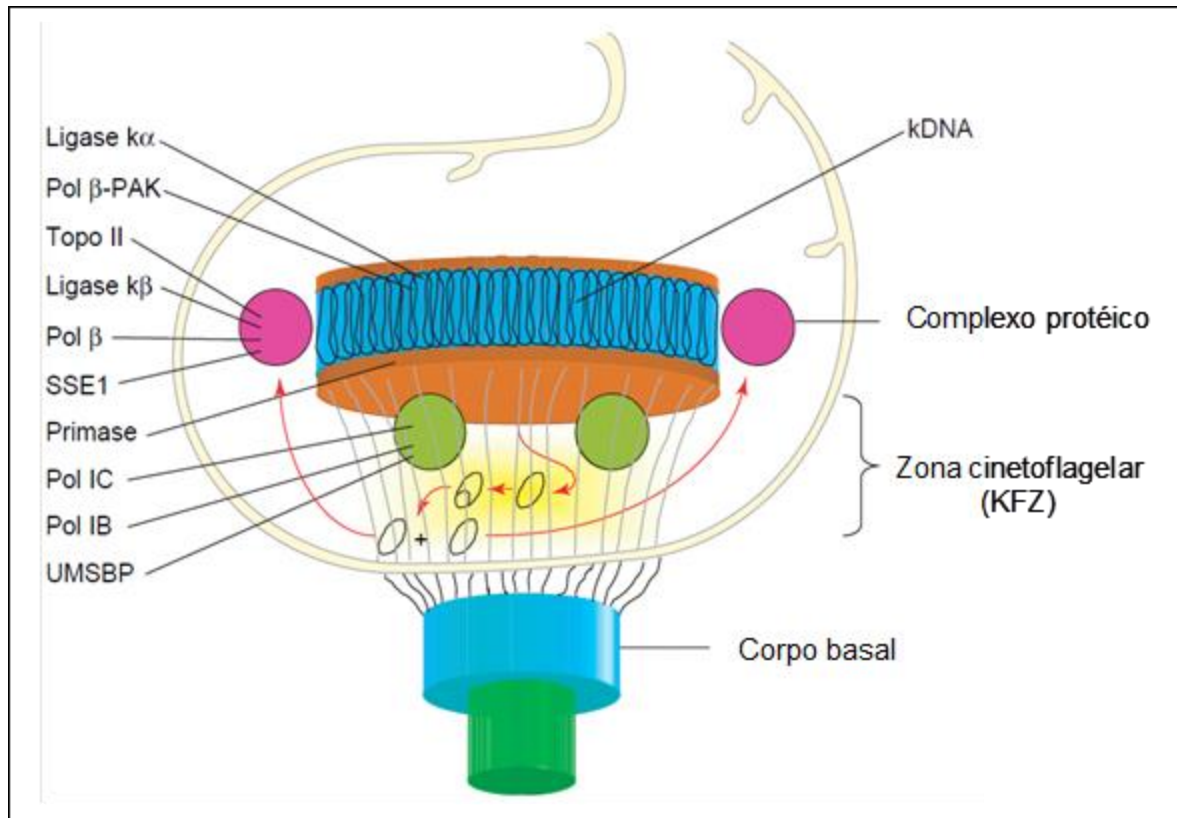


FIGURA 8: REPLICAÇÃO DO kDNA
FONTE: Modificado de LIU *et al.*, 2005.

1.8 Proteínas associadas ao cinetoplasto (KAPs)

Proteínas que se ligam ao DNA também foram identificadas na mitocôndria de uma variedade de organismos eucarióticos variando de levedura até humanos (MAIER *et al.*, 2001). Estas proteínas são codificadas no núcleo da célula e são pós-traducionalmente importadas para a mitocôndria.

Conceitualmente, qualquer proteína que se associe ao kDNA, quer atuando na replicação e transcrição, quer atuando na organização, compactação e segregação da rede, pode ser chamada de KAP (KAP, do inglês Kinetoplast-

Associated Protein). Observou-se que algumas dessas KAPs apresentam características de proteínas histonas H1 (H1 histone-like proteins) por serem proteínas pequenas (17 a 25 kDa), fortemente básicas (pI de 11 a 12,5), interagindo com a carga negativa das moléculas de DNA e com grande conteúdo dos aminoácidos lisina e arginina elevado (aprox. 30 a 50%).

Proteínas associadas com genoma mitochondrial (KAPs) dos tripanosomatídeos e que compartilham características com histonas H1 foram inicialmente identificadas no cinetoplasto do tripanosomatídeo de inseto *Crithidia fasciculata* e denominadas de KAP1 a 5. As H1-KAPs de *C. fasciculata* interagem com minicírculos (XU *et al.*, 1996) e, desse modo podem facilitar a associação, orientação e organização dessas moléculas na rede, pela neutralização das cargas negativas das moléculas de DNA; contribuindo para a condensação, organização e segregação da rede de kDNA. Até o momento foram caracterizadas quatro H1-KAPs de *C. fasciculata* (CfKAP1, 2, 3 and 4). Além das características de histona H1, possuem uma pré-sequência clivável de nove aminoácidos em sua porção N-terminal e que provavelmente está envolvida no transporte da proteína para o cinetoplasto, já que não aparece na proteína madura (XU & RAY, 1993; XU *et al.*, 1996; HINES & RAY, 1998). Através de ensaios de imunofluorescência foi possível confirmar que estas proteínas estão presentes em toda a rede de kDNA. Pela facilidade encontrada nas KAPs purificadas de condensar redes de kDNA *in vitro* (XU *et al.*, 1996), sugere-se que estas estejam envolvidas na organização e condensação do kDNA *in vivo* (LUKES *et al.*, 2001).

As técnicas de deleção de genes são uma ótima ferramenta para elucidar as possíveis funções que um gene pode apresentar. Em *C. fasciculata* foi utilizada a técnica de nocaute gênico para o gene *Cfkap1*, onde mutantes viáveis foram obtidos, mostrando que a forma e a dimensão do cinetoplasto não foram alterados ao contrário da organização da rede de kDNA, que passou a apresentar fibrilas de DNA espessas e uma camada elétron-densa no centro do disco. Quando foi realizada a reintrodução do gene na forma episomal o fenótipo normal da rede de kDNA foi restaurado (LUKES *et al.*, 2001). Também foi realizado o duplo nocaute dos genes *Cfkap2* e *Cfkap3*, o qual da mesma maneira produziu mutantes viáveis, porém com o crescimento bastante reduzido, uma redução na respiração e um aumento nos níveis de mRNAs codificados pelos maxicírculos. Apesar de todas estas alterações o kDNA permaneceu inalterado, mostrando que as proteínas

CfKAP2 e CfKAP3 desempenham um papel diferente ao da CfKAP1, pois estão envolvidas com o metabolismo mitocondrial e proliferação celular ao invés de estarem envolvidas na organização estrutural do kDNA (AVLIYAKULOV *et al.*, 2004).

Com base nesses estudos surgiu o interesse de nosso grupo no estudo de KAPs em *T. cruzi*, visando verificar qual o papel dessas proteínas na organização da rede de kDNA e sua importância nos diferentes estágios do ciclo de vida do parasita. Através de análises bioinformáticas, foram identificadas 6 diferentes H1-KAPs codificadas no genoma do *T. cruzi*, levando em consideração a similaridade com KAPs de *C. fasciculata* (CAVALCANTI *et al.*, 2009). Essas H1-KAPs foram denominadas de KAP3, KAP4a, KAP4b, KAP4c, KAP6 e KAP7. Nosso grupo iniciou a caracterização das proteínas TcKAP4 e TcKAP6, mostrando que elas se localizam no cinetoplasto, mas com padrões distintos de distribuição, dependendo da forma do ciclo de vida do parasita (CAVALCANTI *et al.*, 2009). Mais recentemente, mostramos que o nocaute da TcKAP3 não afeta a proliferação, diferenciação e infectividade do parasita (DE SOUZA *et al.* 2010).

A complexidade da rede de kDNA sugere, portanto, que as diferentes KAPs atuem em conjunto, algumas vezes de modo redundante, para desempenhar funções na condensação, replicação, segregação dessa estrutura.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo principal deste trabalho é caracterizar a função da TcKAP7, avaliando seu papel na biologia do parasita

2.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Analisar a localização subcelular da TcKAP7 através de ensaios de imunofluorescência;
- b) Produzir TcKAP7 recombinante em larga escala para ensaios de biologia estrutural;
- c) Estudar a viabilidade do parasita na ausência do gene *TcKAP7*, para os parasitas viáveis analisar: morfologia e ultraestrutura do cinetoplasto, multiplicação, diferenciação e infectividade.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e Soluções Utilizados

3.1.1 Reagentes

AmershamBioscience: dNTPs; Hybond C; Hybond N; kit ECL de *western blotting*, filmes de raio-X Hyperfilm®, anticorpo monoclonal anti-Histidina.

Bio-Rad: Acrilamida; Agarose (UltraPure DNA grade); Azul de Bromofenol; Bis-Acrilamida; Persulfato de Amônia.

Cult-lab: RPMI 1640.

Difco: Bácto-Ágar; Bactotripton; Extrato de levedura; Infuso de fígado; Triptose.

Invitrogen Inc.: EDTA; Fenol; TRIS; Nick Translation kit; Taq DNA polymerase; IPTG; Agarose; X-Gal; DNA de *λ/HindIII*; Marcador de massa molecular Benchmark, Alexa Flúor 458. 1 kb Plus DNA Ladder, Soro Fetal Bovino, T4 DNA ligase.

Merck: Acetato de Sódio; Ácido Acético Glacial; Cloreto de Cálcio; Cloreto de Potássio; Cloreto de Sódio; Etanol Absoluto;; Glicina; Glicose;; Hidróxido de sódio; Isopropanol; HCl, Na₂HPO₄.

New England Biolabs: Endonucleases de restrição,

Qiagen: Qiaquick PCR Purification kit

Serva Electrophoresis: Alu-Gel S.

Sigma: Acetato de amônia; Ampicilina; Brometo de Etídeo; BSA; Kanamicina; Glicerol; Hepes; Cloreto de Magnésio; Tetraciclina; β-mercaptoetanol; DEAE-celulose; Tween 20; adjuvante completo de Freund;, monoclonal M2 anti-FLAG.

3.1.2 Tampões e Soluções

PBS: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 4,3 mM e KH₂PO₄ 1,5 mM.

PSG: Na₂HPO₄ (anidro) 47,47 mM, NaH₂PO₄ H₂O 2,5 mM, NaCl 36,76 mM, e glicose 55,5 mM.

Solução de tripsinização: tripsina 0,05 % (m/v) e EDTA 0,02 % (m/v) em PBS pH 8,0.

Solução de bloqueio para imunofluorescência: PBS e BSA 1% (albumina sérica bovina).

Solução de bloqueio para *western blot*: TBST e leite em pó desnatado 5%.

Solução de lise para *Toothpick*: NaOH 50 mM, Glicerol 5%, SDS 0,5%, EDTA 5 mM e azul de bromofenol 0,025 %.

Solução Ponceau S: Ponceau S 0,5% em ácido acético 1%.

Solução de coloração para géis de proteína: Coomassie blue R-250 0,1% em metanol/ácido acético (45%/10%).

Solução para descoloração de géis de proteína: Metanol 4%, ácido acético 7,5 %.

Tampão de lise hipotônico: Tris-HCl 10mM pH 7,5, NaCl 10mM, MgCl₂ 5 mM, β -mercaptoetanol 5 mM.

Tampão A para cromatografia de afinidade: Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 500 mM

Tampão B para cromatografia de afinidade: Tampão A contendo imidazol 1M

Tampão B para cromatografia de troca iônica: Tris-HCl 50 mM pH 8,0; NaCl 1M.

Solução de depuração para *Southern blot*: HCl 0,25 M.

Solução desnaturante para *Southern blot*: NaOH 0,5 M e NaCl 1,5 M.

Solução neutralizante para *Southern blot*: Tris-HCl 0,5 M pH 7,5 e NaCl 1,5 M.

Solução Denhardt (50X): ficoll 0,5%, polivinilpirrolidona 0,6% e albumina de soro bovino 0,2%.

Solução de hibridação para *Southern blot*: DNA de esperma de salmão do tipo III 0,1 mg/ml fragmentado por ultra-som e desnaturado, SSC 6X, solução de *denhardt* 6X e SDS 1%.

SSC 20X: NaCl 3 M pH 7,0 e citrato de sódio 0,3 M.

Solução de baixa estringência: SSC 2X e SDS 0,1%.

Solução de média estringência: SSC 1X e SDS 0,1%.

Solução de alta estringência: SSC 0,1X e SDS 0,1%

Tampão de eletroporação para *T. cruzi*: NaCl 140 mM; HEPES (ácido) 25 mM e Na₂HPO₄ 0,74 mM pH 7,5.

Tampão ZPFM de eletroporação de *T. brucei*: NaCl 129 mM, KH₂PO₄ 1,5mM, KCl 8mM, NaH₂PO₄ 8mM, MgCl₂ 1,5mM, CaCl₂ 90 mM e CH₃COONa 2,4 mM pH 7,0.

Tampão TELT: Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 62,5 mM pH 9,0, LiCl 2,5 M e Triton X-100 4%.

Tampão de amostra para DNA 10X: Ficoll 400 25%, azul de bromofenol 0,25% e xileno cianol FF 0,25%.

Tampão de amostra para proteína 4X: Tris-HCl 40 mM pH 6,8, SDS 1%, β -mercaptoetanol 2,5%, glicerol 6% e azul de bromofenol 0,005%.

Tampão de eletroforese para SDS-PAGE 1X: Tris-base 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1%.

Tampão de lise de bactérias: Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 500 mM, PMSF 1 mM.

Tampão para transferência (western blotting) 1X: Tris-base 25 mM, glicina 192 mM e metanol 20%.

Tampão TBE: Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM e EDTA 2 mM.

TBS: Tris-HCl 20 mM pH 8,0 e NaCl 150 mM.

TBST TBS e Tween 20 0,1%.

TE: Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM.

3.1.3 Meios de cultura

LB: Triptona 1%, extrato de levedura 5% e NaCl 1%.

Meio LIT (*liver infusion tryptose*): infuso de fígado 0,5%, NaCl 75,3 mM, KCl 5,4 mM, glicose 10 mM, bacto-triptose 0,5%, Na_2HPO_4 56,4 mM, hemina 0,0025%, soro fetal bovino 10% e extrato de levedura 15 g/l.

Meio TAU: NaCl 190 mM, KCl 17 mM, MgCl_2 2 mM, CaCl_2 2 mM e tampão fosfato 8 mM pH 6,0.

Meio TAU3AAG: meio TAU suplementado com L-prolina 10 mM, glutamato sódico 50 mM, aspartato sódico 2 mM e glicose 10 mM.

3.2 Cultivo do *Trypanosoma cruzi*

Neste trabalho, foi utilizado o clone Dm28c de *T. cruzi* (CONTRERAS *et al.*, 1985, CONTRERAS *et al.*, 1988) nas formas epimastigota, e tripomastigota metacíclico.

3.2.1 Epimastigotas

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT (CAMARGO, 1964) a 28 °C com passagens a cada três dias e inóculo de 1×10^6 células/ml. As formas epimastigotas foram coletadas por centrifugação no terceiro dia de cultivo

(correspondente a fase logarítmica de crescimento, baseada em curva de crescimento realizada nas mesmas condições), quando a densidade celular apresentava-se entre de $1 - 3 \times 10^7$ células/ml.

3.2.2 Tripomastigotas metacíclicos

As formas metacíclicas foram obtidas através do processo de diferenciação *in vitro* (BONALDO *et al.*, 1988). Formas epimastigotas em final de fase logarítmica de crescimento (densidade celular entre $5 - 7 \times 10^7$ células/ml) foram coletadas por centrifugação a $7000 \times g$, por 5 minutos, a 10°C , e ressuspensas em meio TAU, na concentração de 5×10^8 células/ml e mantidas a 28°C por 2 horas. Após este período, correspondente ao estresse nutricional, as células foram transferidas para garrafas de 300 cm^2 contendo 200 ml de meio TAU3AAG (concentração final de 5×10^6 células/ml). Uma proporção dos parasitas que se aderiram à superfície da garrafa de cultivo se diferenciou em metacíclicos, os quais foram liberados no sobrenadante (BONALDO *et al.*, 1988). Estas formas foram purificadas pela passagem através de uma coluna de afinidade contendo a resina DEAE celulose equilibrada em PSG (SOUSA, 1983). Este procedimento foi realizado com o tipo selvagem, para obtenção de extrato protéico e também com o mutante de *T. cruzi* para *TcKAP7*, para verificação da capacidade de diferenciação e infectividade, onde o número de metacíclicos no sobrenadante foi contado após 24, 48, 72 e 96 horas da incubação em meio TAU3AAG.

3.3 Curva de crescimento de *T. cruzi*

Formas epimastigotas de *T. cruzi* clone Dm28c e do mutante de *T. cruzi* para *TcKAP7* foram cultivadas como descrito no item 3.2.1 até atingirem a fase estacionária, para a comparação da taxa de crescimento de ambas. Foram inoculadas 1×10^6 epimastigotas por ml de meio LIT em garrafas de 25 cm^2 e incubadas em seguida a 28°C . Diariamente foi realizada a contagem das culturas em câmaras de Neubauer, em diluições apropriadas até o décimo dia. O gráfico da curva de crescimento comparativa entre a cultura selvagem e a nocaute foi feito utilizando o programa Microsoft Excel.

3.4 Obtenção de DNA de *T. cruzi*

A extração de DNA foi realizada conforme descrito por Medina-Acosta & Cross (1993). Epimastigotas (1×10^7 células) foram coletadas por centrifugação a $7.000 \times g$ por 5 min, lavadas em PBS e ressuspensas em 350 μ l de tampão TELT. Após 5 min de incubação, à temperatura ambiente, foi adicionado à amostra 1 volume de fenol/clorofórmio e o material foi centrifugado a $13.000 \times g$ por 5 min. A fase aquosa foi recolhida e o DNA foi precipitado com 2 volumes de etanol absoluto e coletado por centrifugação a $13.000 \times g$ por 10 min. O DNA presente no sedimento foi lavado com etanol 70%, seco e em seguida ressuspendido em tampão TE contendo RNase a 20 μ g/ml.

3.5 Obtenção de kDNA de *T. cruzi*

A extração do kDNA de *T. cruzi* foi realizada de acordo com Morel e colaboradores (1980), com modificações.

Formas epimastigotas (1×10^9 células) foram coletadas por centrifugação a $4.000 \times g$ por 10 min, lavadas em PBS e ressuspensas em 20 ml de Tampão de Lise Hipotônico. Posteriormente, adicionou-se Sacarose 0,25 M e o material foi centrifugado $6.000 \times g$ por 10 min. O *pellet* foi ressuspendido em 20 ml de Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 10 mM, EDTA 5 mM, SDS 0,5 %. A esta solução foi adicionado 100 μ g de proteinase K e a mesma permaneceu a 37 °C durante a noite. No dia seguinte as células foram transferidas para uma seringa de 50 ml, aonde ocorreu a quebra mecânica do DNA nuclear. Este material foi ultracentrifugado a 27.000 rpm a 4° C durante 1 hora, utilizando o rotor SW28. Após centrifugação o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspendido em 25 ml de TE e novamente ultracentrifugado nas mesmas condições. Após centrifugação o *pellet* foi ressuspendido em 1ml de TE e foi realizada a purificação por fenol/clorofórmio. Após purificação o material foi ressuspendido em 300 μ l de TE e utilizado para ensaios de SAXS.

3.6 Obtenção de extrato proteico de *T. cruzi*

As células foram coletadas por centrifugação (4.000 x g, 5 min a 10 °C) e lavadas duas vezes em PBS pH 7,5. Após as lavagens os parasitas foram ressuspensos em PBS e tampão de amostra 4x foi adicionado de tal maneira que a concentração final fosse de 1×10^6 células equivalentes/ μ l. Os extratos foram fervidos por 5 min e armazenados a - 70 °C.

3.7 Clonagem do gene *TcKAP7*

A sequência do gene *TcKAP7* (ID: Tc00.1047053508719.50) foi obtida a partir do banco de dados do genoma do *T. cruzi* disponível no portal da internet www.genedb.org e a sua região codificante foi amplificada por PCR com os primers KAP7F (5' – AA**AGGATCC**ATGCTAAGAACTGTTCTGCCACTG 3') e KAP7R (5' – TCAGC**GTCGACT**TTATGACGGTGGTGCAGGATCAGCAGCTGCAGTATTTT3') a partir do DNA genômico de *T. cruzi* Dm28c. As sequências de reconhecimento das enzimas de restrição *Bam*HI e *Sal*I (marcadas em negrito) foram adicionadas na extremidade 5' dos *primers* KAP7F e KAP7R, respectivamente. As condições da reação de PCR foram as seguintes: 100 ng de DNA total *T. cruzi*, 10 pmol de cada primer, 200 μ M de cada dNTP, $MgCl_2$ 1,5 mM, tampão *Taq* DNA polimerase 1x, 2,5 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). A reação de PCR foi processada no termociclador modelo 9700 (Applied Biosystems, EUA) com a desnaturação do material por 4 min a 94 °C, seguida de 30 ciclos constando de desnaturação a 94 °C por 30 s, hibridização dos *primers* a 58 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 1 min. O material amplificado foi purificado usando o kit Qiaquick PCR Purification (Qiagen) e digerido com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Sal*I, com uso de 20 U de cada enzima e seus respectivos tampões em volume final de 20 μ l, por 4 h a 37 °C. O material foi novamente purificado e utilizado para ligação com o vetor pET28a previamente digerido com as respectivas enzimas. Bactérias *E. coli* cepa DH5 α foram transformadas com a ligação. A seleção dos clones contendo plasmídeo com o inserto desejado foi realizada através da técnica de palitagem ou de PCR de colônia.

3.8 Obtenção do cDNA de *TcKAP7* através de ensaio de RT-PCR

Com o intuito de verificar a posição do mini-exon no transcrito de *TcKAP7*, realizamos o ensaio de RT-PCR para a obtenção do cDNA de *TcKAP7*.

O protocolo utilizado, foi baseado no manual técnico da Promega (ImProm-II Reverse Transcription System) assim como os reagentes utilizados para essa reação. Aproximadamente 10 µg de RNA foram incubados com o oligonucleotídeo KAP7R, por 10 min a 70 °C e imediatamente transferidos para o gelo. À mistura foi adicionada uma solução de dNTPs (concentração final de 0,5 mM para cada dNTP), MgCl₂ (120 µM), RNase OUT (2 unidades) (Invitrogen), Transcriptase reversa ImProm-II e respectivo tampão. A reação foi incubada por 2 h a 42 °C. As amostras de cDNA foram purificadas por Microcon YM-30 (Millipore), conforme descrição do fabricante e armazenadas a -20 °C. Posteriormente, foi realizada uma reação de PCR utilizando as seguintes condições: 10 ng do cDNA de *TcKAP7* de *T. cruzi*, 10 pmol do *primer* ME (5'-AACGCTATTATTGATACAGTTTCTGTACTATATTG -3') e 10 pmol do *primer* KAP7R, 200 µM de cada dNTP, MgCl₂ 1,5 mM, tampão *Taq* DNA polimerase 1x, 2,5 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). A reação de PCR foi processada no termociclador modelo 9700 (Applied Biosystems, EUA) com a desnaturação do material por 3 min a 94 °C, seguida de 35 ciclos constando de desnaturação a 94 °C por 30 s, hibridização dos primers a 55 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 1 min. O material amplificado foi purificado usando o kit Qiaquick PCR Purification (Qiagen) e clonado diretamente no vetor pGEM®-T Easy (Promega). Bactérias *E. coli* cepa TOP10F' foram transformadas com a ligação e os plasmídeos recombinantes foram selecionados pela técnica da palitagem ou de PCR de colônia (itens 3.9.1 e 3.9.2). Após a minipreparação (item 3.10), o material foi submetido ao sequenciamento de DNA, usando o serviço de sequenciamento da empresa Macrogen (Coréia do Sul).

3.9 Seleção dos clones recombinantes

3.9.1 Técnica de palitagem (toothpick)

As colônias foram coletadas com o auxílio de palitos de dente (toothpick) estéreis e transferidas para o fundo de tubos de micro-centrífuga e para a superfície do meio LB solidificado (com o antibiótico de seleção do plasmídeo) para a obtenção de uma réplica das colônias que foram analisadas (placa-mãe). A cada um dos

tubos foram acrescentados 15 µl do tampão de lise. Os tubos foram incubados em banho-maria a 65 °C por 10 min. As amostras então foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1%, usando o plasmídeo sem inserto como controle. Posteriormente, o gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 µg/ml) por aproximadamente 20 min, lavado com água e analisado sob luz ultravioleta, para em seguida ser fotografado no sistema de fotodocumentação L-Pix (Locus Biotecnologia, Brasil).

3.9.2 Técnica de PCR de colônia

Depois de selecionadas, as colônias foram transferidas para tubos de PCR, contendo os reagentes da PCR e os *primers* que hibridizam com regiões que flanqueiam o fragmento de DNA clonado, em um volume total de 10 µl. As amostras foram incubadas a 94 °C por 3 min e submetidas a 35 ciclos de PCR com as seguintes etapas: 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s e 72 °C por 1 min, finalizando com uma etapa de extensão a 72 °C por 10 min. Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose 1%. Posteriormente, o gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 µg/ml) por aproximadamente 20 min, lavado com água e analisado sob luz ultravioleta. O gel foi fotografado no sistema de foto-documentação L-Pix (Locus Biotecnologia, Brasil).

3.10 Preparação de plasmídeo em pequena escala (miniprep)

Os clones recombinantes foram cultivados em 3 ml de meio LB, contendo o antibiótico apropriado, durante 18 h. As culturas foram então centrifugadas a 12.000 x g por 1min a temperatura ambiente e os plasmídeos recombinantes purificados com o sistema de minipreparação de plasmídeo (Miniprep Qiagen Kit) (QIAGEN) de acordo com as recomendações do fabricante.

3.11 Expressão da proteína TcKAP7 em *E. coli*

Para expressar a proteína recombinante TcKAP7, *E. coli* cepa BL21(DE3)STAR transformada com o plasmídeo pET28a contendo o gene *TcKPA7* (pET28a-TcKAP7) foi cultivada em meio LB contendo 25 µg/ml do antibiótico

kanamicina a 37 °C, sob agitação (pré-inóculo). Após 18 horas de crescimento, uma diluição (1:10) foi realizada em novos tubos contendo meio LB-kanamicina e a cultura foi incubada por 1 h, a 37 °C, sob agitação constante. Após este período, 0.5 mM IPTG (isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosídeo) foi adicionado às culturas. A incubação prosseguiu por mais 3 h nas mesmas condições. Como controle negativo, as células também foram cultivadas nas mesmas condições, porém sem a adição de IPTG (cultura não induzida). Aliquotas das culturas induzidas e não induzidas com IPTG foram processadas para análise em SDS-PAGE.

3.12 Purificação da proteína recombinante TcKAP7

3.12.1 Processamento da amostra

As bactérias após a expressão de TcKAP7, foram sedimentadas por centrifugação e ressuspensas em tampão de lise e lisadas utilizando o microfluidificador modelo M-110L (Microfluidics, EUA). Este método divide a amostra em dois fluxos e os conduz sob alta pressão, gerada por uma válvula pneumática, para uma câmara de interação, também chamada de área de choque. Esta câmara é formada por um sistema de micro-canais dentro de um bloco de cerâmica. Dentro da câmara ocorre cavitação, sonicação e impacto dos dois fluxos em que a amostra foi dividida, levando a lise das células bacterianas (FIGURA 9). Este processo provoca o aumento da temperatura e todo o sistema de tubos que conduz a amostra necessita ser refrigerado com gelo e água a 4°C, para prevenir a precipitação de proteínas solúveis.

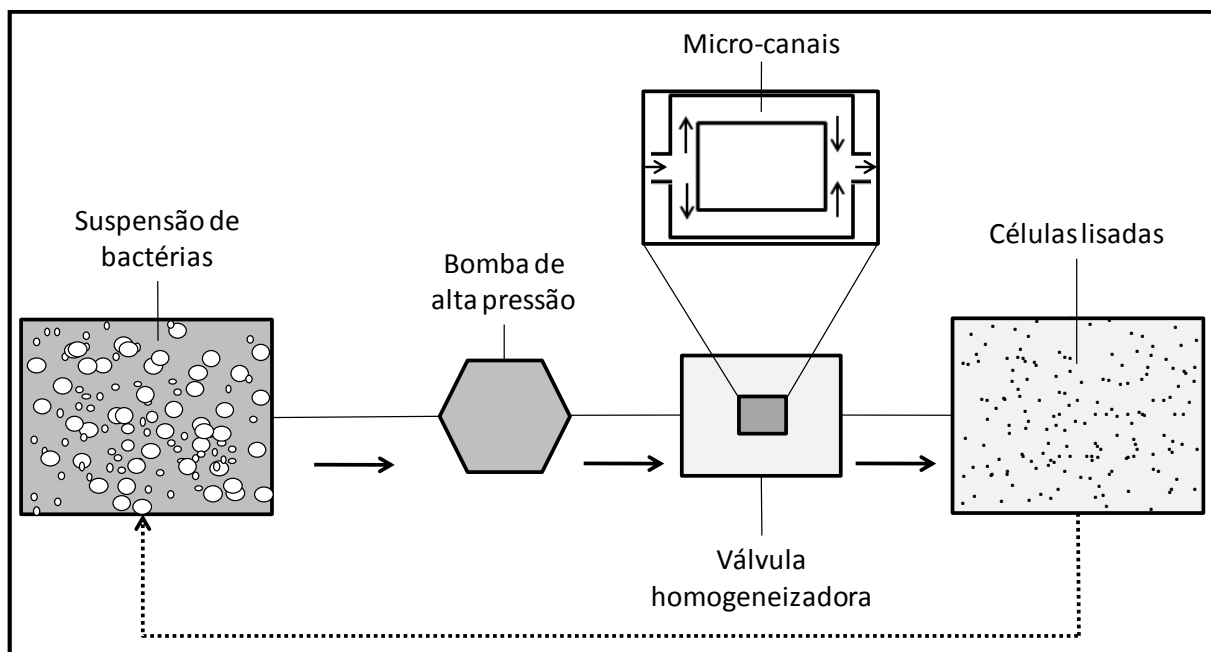


FIGURA 9 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MICROFLUIDIFICADOR

LEGENDA: A suspensão de bactérias é dividida em dois fluxos que se chocam sob alta pressão dentro de micro-canais presentes na câmara de interação da válvula homogeneizadora. Melhores resultados são obtidos aumentando o número de ciclos de passagens. Seta preenchida: direção da amostra. Seta pontilhada: repetindo o ciclo de passagem.

FONTE: Modificado de MAA & HSU, 1999.

Após a lise, o extrato solúvel foi obtido após centrifugação a $30.000 \times g$ por 30 min a 4°C .

3.12.2 Cromatografia de afinidade

Por ser expressa fusionada a uma cauda de seis histidinas, a proteína TcKAP7 pode ser separada dos extratos celulares a partir da utilização de resina de níquel, da qual posteriormente a proteína será eluída.

A purificação da proteína TcKPA7, presente no sobrenadante, foi realizada em sistema FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography – GE Healthcare), com coluna HiTrap Chelating de 1 mL (GE Healthcare). A coluna foi carregada com solução NiSO_4 100 mM e equilibrada com tampão A para cromatografia de afinidade. Durante a purificação, foi utilizado um gradiente de 0-100% de tampão B para cromatografia de afinidade. As frações provenientes da cromatografia foram analisadas através de SDS-PAGE.

3.12.3 Cromatografia de troca iônica

Para eliminar contaminantes remanescentes da cromatografia de afinidade, a amostra contendo a proteína de interesse foi submetida a uma segunda etapa cromatográfica: cromatografia de troca iônica, utilizando-se a coluna *HiTrap™ SP* (GE Healthcare) no sistema de FPLC (GE Healthcare).

Primeiramente, a amostra foi diluída para redução da concentração salina e a coluna foi lavada com 2 volumes de tampão B para cromatografia de troca iônica e depois com 2 volumes de tampão A utilizado na cromatografia de afinidade. O gradiente de passagem do tampão B foi de 0% a 100% e a proteína TcKAP7 foi obtida na fração de material não ligado à resina (*Flow-through*) (FT).

3.12.4 Cromatografia de gel filtração

Amostras da cromatografia de troca iônica que continham a proteína de interesse foram concentradas através de filtração. A solução foi colocada em filtro Amicon Ultra MWCO 10000 (Milipore) e centrifugada a 4000 rpm a 4 °C. O experimento foi realizado em sistema FPLC (GE Healthcare), com a coluna Superdex 200 HR 10/30 (GE Healthcare), em tampão HEPES 20 mM pH 7,4 e de cloreto de sódio 100 mM.

3.13 Espalhamento Dinâmico de Luz – DLS

O experimento foi realizado em equipamento *DynaPro Molecular instrument* a 4 °C. As amostras foram previamente centrifugadas por 5 minutos a 15.000 rpm a 4 °C. A coleta de dados foi realizada com intervalos de 2 segundos com 100 aquisições. Para cada leitura utilizou-se 5 µl de amostra proteica.

3.14 Espectroscopia de dicroísmo circular (CD)

O espectro de CD foi coletado usando espectropolarímetro Jasco J-715 (Jasco Corporation, Tóquio, Japão), sendo a temperatura mantida a 20 °C através de um Peltier rType Control System PFD425S (JASCO). Todos os dados foram coletados usando cubeta de quartzo de 1 mm de caminho óptico.

Mediu-se a elipticidade em graus na região do UV distante, no intervalo de comprimento de onda de 260 nm a 200 nm, com uma velocidade de 100 nm/min, sendo feitas no total 30 leituras com resposta de 1 segundo em varredura contínua.

Os valores obtidos em miligraus foram convertidos para elipticidade molar por resíduo ($[\theta]_{MRW}$), em miligraus.cm².dmol⁻¹, que é definida pela equação (Adler et al., 1973):

$$[\theta] = \frac{\theta_{obs} \times MRW}{10 \times d \times c}$$

Onde θ_{obs} é a elipsidade observada em graus, MRW é o peso molecular médio dos resíduos da proteína, d é o caminho óptico da cubeta em centímetros e c é a concentração da proteína em mg/mL. O MRW é calculado dividindo-se o peso molecular da proteína pelo número de resíduos.

3.15 Quantificação e concentração

As amostras obtidas a partir da purificação tiveram a concentração calculada utilizando a absorbância mensurada pelo aparelho NanoDrop (Thermo Fisher Scientific), levando-se em consideração o coeficiente de extinção e teórico da proteína, obtido a partir do ProtParam (<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>) e o peso molecular da proteína que é de cerca de 28 kDa.

Obtidas as concentrações, a amostra foi concentrada pelo método de filtração utilizando o filtro Amicon® Ultra Centrifugal Filter (Millipore) com poro de 10.000 Da. A amostra foi centrifugada até a obtenção de uma concentração final de 5 mg/ml para os ensaios de cristalização. Uma alíquota da proteína concentrada foi utilizada para análise por SDS-PAGE.

3.16 Ensaios de Cristalização

Os ensaios de cristalização foram realizados empregando-se a técnica de difusão de vapor em gota sentada utilizando-se os equipamentos disponíveis no Laboratório Robotizado de Cristalização de Proteínas, LNBio. Os ensaios foram feitos em placas de 96 poços, e as gotas preparadas pelo robô *Honeybee*, utilizando-se os kits disponíveis no laboratório Crystal Screen HT ([Hampton Research](#)), JCSG+ Suite (Molecular Dimensions), PACT Suite (Molecular

Dimensions), Precipitant Synergy (Rigaku Reagents), SaltRx HT ([Hampton Research](#)), Wizard I&II (Rigaku Reagents).

3.17 Espalhamento de raio-X a baixo ângulo (SAXS)

Através da técnica de SAXS, informações sobre a massa molecular das partículas espalhadoras e do raio de giro (R_g) da proteína de estudo são obtidos a partir dos dados coletados. Por meio de programas computacionais como DAMMIN (SVERGUN, 1999) e GASBOR (SVERGUN *et al.*, 2001), um modelo de baixa resolução da forma da proteína pode ser obtido.

Os dados de SAXS foram obtidos na linha de luz D02A – SAXS2, no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas-SP, Brasil, usando comprimento de onda de 1,48 Å e um detector bidimensional, com arranjo CCD (MARCCD, USA), de 165 mm. A distância do detector para a amostra foi de 1068,04 mm e os dados na faixa de 0,02 nm⁻¹ para 0,21 nm⁻¹ foram coletados usando proteína pura nas concentrações de 5 mg/ml, em tampão em 20 mM HEPES pH 7,4 e 100 mM de cloreto de sódio. Exposições de 300 e 600 s foram realizadas e os dados do tampão foram coletados antes e depois dos dados da amostra para fazer a correção do solvente e normalização do espalhamento.

Ajuste dos dados experimentais e avaliação da função $p(R)$ foram realizados utilizando o programa GNOM (SVERGUN, 1992). O envelope a baixa resolução de TcKAP7 foi determinado usando modelagem *ab initio* implementada no programa DAMMIN. O modelo a baixa resolução e o modelo da estrutura tridimensional foram superpostas usando o programa SUPCOMB (KOZIN & SVERGUN, 2001).

3.18 Modelagem de TcKAP7

Um modelo da estrutura tridimensional de TcKAP7 foi construído. Para a construção do modelo foi utilizado o programa MODELLER (SALI & BLUNDELL, 1993), este programa é utilizado para a modelagem por homologia a estruturas tridimensionais de proteínas. O programa automaticamente constrói um modelo baseado na análise de um alinhamento de sequências entre a proteína para a qual se deseja construir o modelo e uma proteína relacionada cuja estrutura tridimensional já foi resolvida. A qualidade do modelo pode ser avaliada, por

exemplo, através de gráficos e tabelas que analisam restrições químicas e físicas de cada átomo constituinte do modelo.

3.19 Obtenção de antissoro policlonal contra TcKAP7

A proteína TcKPA7 recombinante purificada foi inoculada em camundongos da linhagem BALBc, por via intraperitonal, com 4 aplicações de aproximadamente 20-50 µg de antígeno em intervalos de 15 dias, seguida de obtenção do soro após 1 semana da última inoculação. O antígeno foi emulsificado em adjuvante completo de Freund, na primeira inoculação e com adjuvante a base de hidróxido de alumínio (Alu-Gel, Serva) nas inoculações posteriores.

3.20 Análise da expressão do gene *TcKAP7* e de seu mutante por ensaio tipo *western blot*

Este procedimento foi executado segundo o método de Towbin e colaboradores (1979). Alíquotas de extratos de *T. cruzi* equivalentes a 1×10^7 células foram submetidos à SDS-PAGE. Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond C, Amersham Biosciences), em tampão de western por 2 h, a 60 V ou 20 V por 16 h. Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau S e descorada suavemente com água bidestilada para a identificação das bandas do marcador de massa molecular. A membrana foi então incubada em solução de bloqueio por 30 min sob agitação suave.

Após o bloqueio, a membrana foi incubada com os soros policlonais ou anticorpos monoclonais em TBST-leite por aproximadamente 1 h a 37°C. A membrana foi lavada 5 vezes com TBST. Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com a enzima peroxidase (Pierce – Thermo Scientific), por 1h na diluição de 1:6000 em TBST-leite a temperatura ambiente. A membrana foi submetida a mais cinco lavagens com TBST e a reação era evidenciada utilizando substrato quimioluminescente (West Pico, Pierce – ThermoScientific) sobre a membrana, a qual era exposta a um filme para raios-X (Hyperfilm ECL, GE).

3.21 Superexpressão de TcKAP7

3.21.1 Amplificação e clonagem do gene *TcKAP7* no vetor pNEO3xFlag para superexpressão da proteína

O gene *TcKAP7* foi clonado no vetor pNEO3xFLAG, construído no nosso laboratório a partir do vetor pTcGW-ProtCcarboxi (BATISTA *et al.*, 2010), que utiliza o sistema Gateway de clonagem (Invitrogen). Os vetores foram construídos utilizando-se como base o pBluescript II (Stratagene, San Diego, USA) onde foram inseridas três sequências que codificam para regiões intergênicas (IR) de *T. cruzi*. A primeira, TcUIR, é a região intergênica do locus de ubiquitina/calmodulina, de *T. cruzi* (BATISTA *et al.*, 2010). As outras duas regiões intergênicas ITR1 e ITR2 foram selecionadas a partir de genes de copia única no genoma e que possuem um nível de expressão constitutivo nos estágios epimastigota e tripomastigota metacíclicos avaliados por dados de proteômica e RNAseq (Comunicação pessoal Michel Batista). Além disso, esse vetor confere à região C-terminal da proteína recombinante, resultante da clonagem neste vetor, três etiquetas FLAG (sequência DYKDDDDK) em tandem (FIGURA 10).



FIGURA 10: VETOR PARA EXPRESSÃO EM *T. CRUZI* P3XFLAG.

LEGENDA: PR – PROMOTOR RIBOSOMAL. TCUIR, ITR1 E ITR2 - REGIÕES INTERGENICAS. ATTR1 E ATTR2 – REGIÕES PARA RECOMBINAÇÃO. CM® - RESISTÊNCIA A CLORANFENICOL. CCDB – GENE PARA SELEÇÃO NEGATIVA DURANTE A CLONAGEM. 3XFLAG – TRÊS ETIQUETAS DE FLAG (DYKDDDDK) NEOMICINA – GENE DE RESISTÊNCIA A NEOMICINA.

O gene *TcKAP7* foi amplificado utilizando os *primers* específicos KAP7GtwFor (5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTGCCCCGCGAAGTATTCAGCAGCCC) e KAP7GtwRev (5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCGTGGTACATGGCGTACGGGTTG),

os quais possuem os sítios attB, indicados em negrito. As condições desta reação de PCR foram as seguintes: 100 ng de DNA genômico de *T. cruzi*, 10 pmol de cada primer, 200 µM de cada dNTP, MgSO₄ 2 mM, tampão Taq DNA polimerase High Fidelity 1x, 1U de Platinum Taq DNA polimerase high fidelity (Invitrogen). A reação de PCR foi processada no termociclador modelo 9700 (AppliedBiosystems, EUA) com a desnaturação do material por 5 min a 94 °C, seguida de 35 ciclos constando de desnaturação a 94 °C por 30 s, hibridização dos *primers* a 58 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 1,5 min.

O gene amplificado foi clonado no vetor de entrada pDONRTM221 (Invitrogen). A reação foi feita com 150 ng dos produtos de PCR, contendo os sítios attB, 150 ng do plasmídeo pDONRTM221, 1 µL de BP ClonaseTM enzyme mix e TE para um volume final de 10 µL e com incubação a 25 °C por 16 h. Foi então adicionado 1 µL de proteinase K (2 mg/mL) com incubação por 10 min a 37 °C. Os clones em pDONRTM221 foram transformados em células cálcio-competentes *E. coli* DH5α, conforme protocolo de transformação de células cálcio-competentes. Após transformação, a cultura foi semeada em placa de LB/Kan (kanamicina 25 µg/mL) e incubada a 37 °C durante 16 h.

Para verificar a presença de clones com os insertos de interesse, foi feita a técnica da palitagem. As colônias selecionadas foram inoculadas em 5 mL de meio LB/Kan e incubadas por 16 h a 37 °C com agitação (190 rpm). A purificação dos plasmídeos foi realizada com o kit QIAprep® Spin Miniprep (Qiagen) conforme orientações do fabricante.

Após esta etapa, foi necessário transferir os insertos para o vetor de destino pNEO3xFlag. A troca de insertos entre os vetores de entrada e destino, denominada de reação LR, foi realizada conforme orientações do fabricante (Gateway LR clonase enzyme mix) e células cálcio-competentes foram transformadas com os produtos das recombinações, conforme descrito anteriormente, semeadas em placas de LB/Amp e incubadas a 37 °C durante 16 h.

A verificação de clones positivos foi realizada através de PCR de colônias. As colônias selecionadas foram inoculadas em 5 mL de meio LB contendo ampicilina (100 µg/mL), e incubada a 37° C por 16 h sob agitação (200 rpm):O plasmídeo contendo o gene *TcKAP7* foi denominado de pNEO_KAP7_3xFLAG.

3.21.2 Transfecção por eletroporação

A transfecção das formas epimastigotas de *T. cruzi* foi feita pela técnica de eletroporação, utilizando o equipamento genepulser® apparatus (Bio-Rad) e cubetas estéreis de eletroporação gene pulser/micro pulser® 0,2 cm (Bio-Rad). Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT até uma densidade celular de 3×10^7 células/ml. Um volume de cultura correspondendo a 1×10^9 parasitas foi centrifugado ($4.000 \times g$, $4^\circ C$). O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em tampão de eletroporação estéril e submetidas a centrifugação nas condições acima. O sedimento celular foi ressuspendido em 2 ml de tampão de eletroporação. Em cubetas de eletroporação, previamente resfriadas a $4^\circ C$, foram misturados 400 μL (2×10^8 células) da suspensão dos parasitas e 50 μL (20 μg) do plasmídeo para superexpressão (pNEO_KAP7_3XFLAG). Em paralelo, parasitas foram submetidos às mesmas condições, mas na ausência de DNA (controle negativo da transfecção).

As cubetas foram então mantidas em gelo por 10 min. Em seguida, os parasitas foram transfectados com dois pulsos sequenciais de 500 μF e 450 volts. Após o esse procedimento, as cubetas foram mantidas em gelo por mais 5 min. A suspensão de parasitas transfectados foi então inoculada em 10 mL de meio LIT suplementado com 10.000 U de penicilina e estreptomicina a 10 $\mu g/mL$.

3.21.3 Seleção dos transfectantes

O gene para a enzima neomicina fosfotransferase foi utilizado como marcador de seleção dos parasitas carregando o plasmídeo para a superexpressão pNEO_KAP7_3XFLAG. Para tanto, o antibiótico G418 foi adicionado às culturas após 24 h da transfecção, na concentração final de 500 $\mu g/mL$. Entre 3 e 4 dias após a transfecção, foi realizada a primeira passagem (1:4). A partir desse ponto, foram feitas passagens semanais na proporção de 1/10, até que não fosse observado crescimento nas duas últimas passagens da cultura do controle negativo da transfecção.

A expressão da proteína KAP7-FLAG foi analisada através de ensaios de *western blot* e imunofluorescência.

3.22 Deleção do gene *TcKAP7* por nocaute gênico

3.22.1 Amplificação e clonagem das regiões a montante e a jusante do gene *TcKAP7*

As regiões a montante (*upstream*) e a jusante (*downstream*) do gene *TcKAP7*, respectivamente denominadas de UPSKAP7 (521 pb) e DOWNKAP7 (500 pb), foram amplificadas por PCR, usando os *primers* descritos nas TABELAS 1 E 2. A região denominada DOWNKAP7 contém ainda 139 pb do final da região codante de *TcKAP7*.

QUADRO 1 - RELAÇÃO DOS *PRIMERS* UTILIZADOS PARA A CLONAGEM DA REGIÃO UPSTREAM DE *TcKAP7* NO VETOR pNEO1

UPSKAP7F	GGGG GT CGACCGTTGCTGGTTTTCTTTGGTGT
UPSKAP7R	GGGA AG CTTGCTTCAAAACGTCTATGCGGGC

Os sítios das enzimas de restrição Sall (GTCGAC) e HindIII (AAGCTT) adicionados aos *primers* estão em negrito.

QUADRO 2 - RELAÇÃO DOS *PRIMERS* UTILIZADOS PARA A CLONAGEM DA REGIÃO DOWNSTREAM DE *TcKAP7* NO VETOR pNEO1

DOWNKAP7F	GGGGA ATT CGCCTCATATGACGCATCTCCCA
DOWNKAP7R	GGGG GAT CCTGTTGGCGCTGTCAAGGAAGTAAG

Os sítios das enzimas de restrição EcoRI (GAATTC) e BamHI (GGATCC) adicionados aos *primers* estão em negrito.

As reações de PCR foram realizadas nas seguintes condições: 100 ng de DNA total de *T. cruzi* Dm28c, 10 pmol dos oligonucleotídeos F e R, 200 µM de cada dNTP, MgCl₂ 1.5 mM, tampão *Taq* DNA polimerase 1x, 2,5 unidades de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, EUA). A reação de PCR foi processada no termociclador modelo 9700 (Applied Biosystems, EUA) nas seguintes condições: Desnaturação do

material por 4 min a 94 °C, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 92 °C por 30 s, hibridização dos oligonucleotídeos a 56 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 1 min. O material amplificado foi purificado usando o Qiaquick PCR Purification (Qiagen). O DNA purificado foi digerido com enzimas de restrição apropriadas para a clonagem dos fragmentos nos vetores pNEO1. O plasmídeo resultante da clonagem das regiões UPSKAP7 e DOWNKAP7 foi denominado de pNEO1kap7 (Figura 11A).

Uma vez que o genoma do *T. cruzi* é diploide, construímos um segundo plasmídeo para o nocaute do segundo alelo do gene *TcKAP7*, tendo como marca de seleção o gene que codifica resistência a higromicina B. Esse plasmídeo foi construído usando como molde o plasmídeo pNEO1kap7. O plasmídeo pNEO1kap7 foi digerido com *HindIII* para remoção do gene neo e uma pequena porção da região DOWNSTREAM (220 pb). O plasmídeo linearizado foi purificado do gel de agarose usando o kit Qiaquick PCR Purification (Qiagen) e ligado com o gene hgro. O gene hgro foi amplificado usando os primers HIGROF (GGGGGAAGCTTATGAAAAAGCCTGAACTCACCGCGAC) e HIGROR (GGGAAGCTTCTATTCCTTTGCCCTCGGACGAGTGCTG), ambos contendo na extremidade 5' o sítio para a enzima de restrição *HindIII* (em negrito). O plasmídeo resultante da ligação foi denominado de pHIGRO1kap7 (FIGURA 11B).

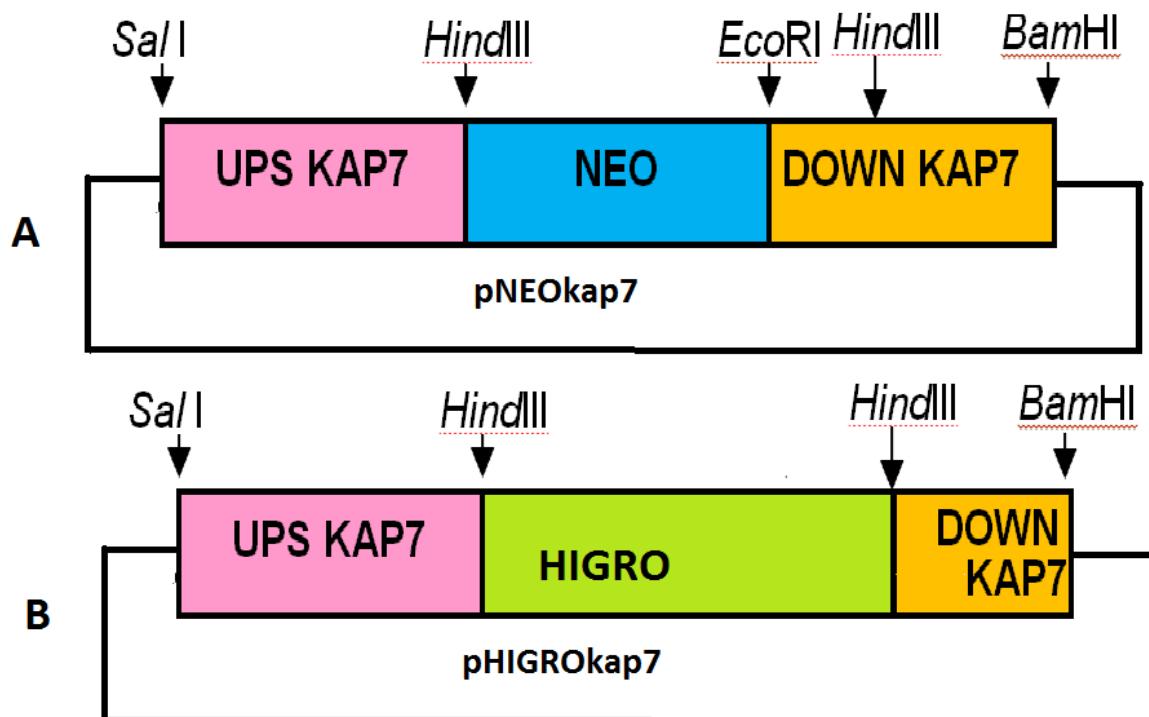


FIGURA 11: ESQUEMA DA CONSTRUÇÃO DOS VETORES UTILIZADOS PARA O NOCAUTE DO GENE *TcKAP7*

LEGENDA: Nesta figura é observada a inserção das sequências flanqueadoras do gene *TcKAP7*, juntamente com os respectivos sítios para cada enzima de restrição, nos vetores de clonagem pNEO1 e pHIGRO1.

3.22.2 Amplificação dos cassetes UPS-NEO-DOWN e UPS-HIGRO-DOWN para transfecção de *T. cruzi*

Os dois plasmídeos recombinantes foram purificados pelo método da lise alcalina, utilizando o kit de minipreparação de plasmídeos (Qiagen). As minipreps foram utilizadas para a amplificação da região UPS-NEO-DOWN (cassete NEO) e da região UPS-HIGRO-DOWN (cassete HYG) por PCR, usando os *primers* UPSKAP7F e DOWNKAP7R. As reações de PCR foram realizadas nas seguintes condições: 20 ng do plasmídeo pNEO1kap7 ou pHIGRO1kap7, 10 pmol dos *primers* UPSKAP7F e DOWNKAP7R, 200 µM de cada dNTP, MgCl₂ 1,5 mM, tampão Taq DNA polimerase 1x, 2,5 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen, EUA). A reação de PCR foi processada no termociclador modelo 9700 (AppliedBiosystems, EUA) nas seguintes condições: Desnaturação do material por 4 min a 94 °C, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 92 °C por 30 s, hibridização dos oligonucleotídeos a 56 °C por 30 s e

extensão a 68 °C por 2 min. O material amplificado foi submetido à eletroforese em gel preparativo de agarose 1%. O gel foi corado com brometo de etídeo (1 µg/ml) e a banda correspondente a cada cassete foi removida do gel com auxílio de uma lâmina de bisturi. O DNA foi purificado por eletroeluição, dentro de saco de diálise, nas condições de 100 V por 1 hora em tampão TBE. Para obter massa de DNA suficiente para a transfecção (20 µg), foram feitas 10 reações de PCR com 100 µl cada uma.

3.22.3 Transfecção do *T. cruzi* com o cassete UPS-NEO-DOWN

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT até 2×10^7 células/ml. Os parasitas (1×10^8 células) foram coletados por centrifugação a 6.000 x g por 10 min a 4 °C. O sedimento celular foi lavado com PBS estéril e ressuspensionado em 1 ml de solução de eletroporação. Volumes correspondentes a 0,4 ml da suspensão de células foram transferidos para cubetas de eletroporação estéreis (0,2 cm de gap) (BioRad) e pré-resfriadas. Em uma delas foram adicionados de 20 µg do fragmento representando o cassete NEO. A outra cubeta contendo apenas a suspensão de parasitas foi usada como controle. Após 10 minutos no gelo, as amostras contidas nas cubetas foram submetidas a 2 pulsos de 450 volts, 500 µF, utilizando o eletroporador GenePulser® II Apparatus (Bio-Rad). As amostras foram incubadas novamente por 5 a 10 minutos no gelo, em seguida foram transferidas para garrafas de cultura de 25 cm², contendo 10 ml de meio LIT (suplementado com 10.000 U de penicilina e estreptomicina a 10 mg/ml). As culturas foram então incubadas a 28 °C. Após 24 horas de incubação adicionou-se o antibiótico G418 na concentração de 500 µg/ml. As culturas foram mantidas por sucessivas passagens (diluição de 1:10) em meio LIT suplementado com G418 a cada 8-10 dias, até a ausência de proliferação celular na cultura controle. Os parasitas, nos quais *TcKAP7* foi substituído pelo gene neo, foram denominados de *T. cruzi*^(kap7/kap7::neo) e foram testados para a correta inserção do gene neo no locus genômico de *TcKAP7*.

3.22.4 Extração de DNA dos transfectantes

T. cruzi transfectado com o cassete NEO (*T. cruzi*^(kap7/kap7::neo)) foi cultivado em meio LIT suplementado com G418 (500 µg/ml) até uma densidade de 3×10^7 células/ml. Os parasitas foram coletados por centrifugação por 1 min a $6.000 \times g$ e lavados com PBS. Em seguida, os parasitas foram lisados gentilmente em 350 µl de tampão TELT, conforme descrito no item 3.4.

3.22.5 Análise por PCR do DNA dos parasitas transfectados com o cassete UPS-NEO-DOWN

As reações de PCR foram realizadas utilizando *primers* externos: EXTF (CCCGCTACGACTGCCCTCCACGCGGAAGGGAA) e EXTR (AAGTAAACGGGAGAAGCAACACGATGGGAGGCTC), que não estão presentes na construção do cassete UPS-NEO-DOWN, combinados com os *primers* NEOF (GGGGAAGCTTATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAG) e NEOR (GGGGGAATTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCGATAGAA).

As condições das reações foram as seguintes: 100 ng do DNA total de *T. cruzi* Dm28c tipo selvagem (*T. cruzi*^(kap7/kap7) ou tipo selvagem) ou do DNA da população *T. cruzi*^(kap7/kap7::neo) (mutante simples nocaute); 10 pmol dos *primers* EXTF + NEOR e NEOF + EXTR, 200 µM de cada dNTP, MgCl₂ 1,5 mM, tampão *Taq* DNA polimerase 1x, 2,5 unidades de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, EUA). A reação de PCR foi processada no termociclador modelo 9700 (AppliedBiosystems, EUA) nas seguintes condições: Desnaturação do material por 4 min a 94 °C, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 92 °C por 30 s, hibridização dos oligonucleotídeos a 55 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 2 min.

3.22.6 Transfecção do *T. cruzi* com o cassete UPS-HIGRO-DOWN

Formas epimastigotas da população mutante de *T. cruzi* (*kap7/kap7::neo*) foram cultivadas em meio LIT, suplementado com G418 (500 µg/ml) até a densidade de 2×10^7 células/ml. Os parasitas (1×10^8 células) foram coletados por centrifugação a $6.000 \times g$ por 10 min a 4 °C e submetidos ao processo de eletroporação, como descrito no item 3.20.2. Para a transfecção foram usados 20 µg do fragmento

representando o cassete UPS-HIGRO-DOWN. As culturas (transfectada e controle) foram então incubadas a 28 °C em LIT suplementado de G418. Após 24 horas de incubação foi adicionado o antibiótico higromicina ao meio de cultura na concentração de 500 µg/ml. As culturas foram mantidas por sucessivas passagens (diluição de 1:10) em meio LIT suplementado com G418 e higromicina a cada 8-10 dias, até a ausência de proliferação celular na cultura controle. Mutantes, nos quais os dois alelos de *TcKAP7* foram removidos e substituídos pelos genes NEO e HIGRO, foram denominados com genótipo *T. cruzi*^(kap7::neo/kap7::higro).

3.22.7 Análise por PCR do DNA dos parasitas transfectados com o cassete UPS-HIGRO-DOWN

As reações de PCR foram realizadas utilizando *primers* externos EXTF e EXTR (item 3.22.5), combinados com os *primers* HIGROF e HIGROR (item 3.22.1).

As reações de PCR foram realizadas nas seguintes condições: 100 ng do DNA total de *T. cruzi*^(kap7/kap7) ou do DNA do *T. cruzi*^(kap7::neo/kap7::higro), 10 pmol dos *primers* EXTF + HIGROR e HIGROF + EXTR, 200 µM de cada dNTP, MgCl₂ 1,5 mM, tampão *Taq* DNA polimerase 1x, 2,5 unidades de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, EUA). A reação de PCR foi processada no termociclador modelo 9700 (Applied Biosystems, EUA) nas seguintes condições: Desnaturação do material por 4 min a 94 °C, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 92 °C por 30 s, hibridização dos oligonucleotídeos a 55 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 2 min.

3.22.8 Análise da organização do gene *TcKAP7* e da eficiência de seu nocaute através de ensaio do tipo *Southern blot*

O DNA genômico (5 µg) de *T. cruzi*^{kap7/kap7} e *T. cruzi*^{kap7::neo/kap7::higro} foi submetido a digestão com a enzima de restrição *HindIII*, de acordo com as especificações do fornecedor. Após 3 horas, o DNA digerido foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TBE a 100 V. O gel foi corado por brometo de etídio (0,5 µg/mL) e fotografado sob a luz ultravioleta (310 nm). Posteriormente, o gel foi tratado com soluções de depurinação por 15 minutos, de desnaturação por 30 minutos (2 vezes) e solução de neutralização por 30 minutos (2 vezes). O DNA foi transferido para uma membrana de *nylon* (Hybond N,

AmershamBiosciences) por capilaridade (SAMBROOK *et al.*, 1989), utilizando-se de uma “ponte” de papel 3 MM embebido em SSC 20X. Após a transferência o DNA foi fixado à membrana por exposição à luz ultravioleta com uma dose de 120 mJ/cm^2 , usando o aparelho Spectrolinker (Spectronicscorp., USA). A membrana contendo o DNA de *T. cruzi* foi pré-hibridizada em solução de hibridização de DNA por 1 hora a 65°C , seguido da adição da sonda marcada radioativamente com $\alpha\text{-}[P^{32}]\text{-dCTP}$ ($10 \mu\text{Ci}/\mu\text{l}$; 3.000 Ci/mmol) (Amersham Biosciences), preparada segundo método de *nick translation*, descrito por Rigby *et al.* (1977), utilizando-se o método de iniciação por random primers (Megaprimer DNA labeling kit – GE), conforme recomendações do fabricante.

Foram utilizadas 3 sondas, são elas: fragmento do gene *TcKAP7* correspondendo a região compreendida entre os nucleotídeos 1 e 560, o gene *neo* e o gene *higro*. Após a marcação, as sondas foram purificadas em colunas de Sephadex G-50 (ProbeQuant – Amersham Biosciences) e adicionadas ao tampão de hibridização na concentração de $5 \times 10^6 \text{ cpm/ml}$. As membranas foram incubadas por 16 horas a 65°C e, em seguida, lavadas nesta temperatura duas vezes por 30 minutos com soluções de alta, média e baixa estringência. As membranas foram expostas a filme de raio-X (Hyperfilm[®], Amersham Biosciences) na presença de tela intensificadora (Dupont Cronex Lightning Plus), por tempo que varia entre 1 a 3 dias a -70°C .

3.23 Localização celular da proteína TcKAP7 através de ensaio de imunofluorescência

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram coletadas por centrifugação ($4.000 \times g$, 3 a 10°C), lavadas duas vezes em PBS e depositadas sobre lâminas de vidro previamente tratadas com poli-L-lisina 0,01% diluída em PBS. Os parasitas foram então fixados com paraformaldeído 4 % em PBS, permeabilizados com Triton X-100 0,1 % em PBS, por 2 min à temperatura ambiente e incubados a 4°C durante 16 h em solução de bloqueio para imunofluorescência (PBS 1X + BSA 1 %). Após o bloqueio, os parasitas foram incubados à temperatura ambiente por 1 h com o anticorpo monoclonal anti-FLAG em uma diluição de 1:1000 em solução de bloqueio para imunofluorescência. Depois disso, as lâminas foram submetidas a 5 lavagens

de 5 min cada, em PBS. Em seguida, os parasitas foram incubados à temperatura ambiente por 1 hora com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado ao fluoróforo Alexa Fluor 488 (Invitrogen) diluído 1:600 em solução de bloqueio. As lâminas foram lavadas 5 vezes com PBS e posteriormente incubadas com o corante Hoechst 33342 (Invitrogen) a 2 µg/µL em PBS por 5 min. Após cinco lavagens com PBS, as lâminas foram montadas com ProLong Gold Antifade (Invitrogen) sobre uma lâmina de microscopia ótica. O material foi observado nos microscópios Leica SP5 e DMI6000.

3.24 Análise da ultraestrutura do cinetoplasto do mutante de *T. cruzi* para *TcKAP7* por microscopia eletrônica de transmissão

Os parasitas foram coletados, lavados com PBS e fixados em solução contendo 2,5% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído e tampão cacodilato 0,1 M. Em seguida, os parasitas foram fixados por 1 h em solução de 1% de tetróxido de Ósmio e 0,8% de ferricianeto de potássio, diluídos em tampão cacodilato 0,1 M. As células foram então desidratadas em solução contendo concentrações crescentes de acetona e incluídas em Epon. Após a obtenção de cortes ultrafinos dos parasitas, os mesmos foram contrastados em acetato de uranila e citrato de Chumbo antes de serem observados e fotografados no microscópio eletrônico de transmissão Zeiss 900.

3.25 Coloração dos parasitas transfectados

A coloração dos parasitas foi realizada pelo método panótico rápido (Laborclin Pinhais Paraná Brasil) modificado.

Formas epimastigotas do mutante de *T. cruzi* para *TcKAP7* foram cultivadas como descrito no item 3.2.1. Os parasitas foram coletados por centrifugação de 1 min a 4.000 x g e ressuspensos em PBS. Desta suspensão uma gota foi retirada e depositada sobre lâminas previamente limpas. Quando secas as lâminas foram imersas, individualmente, na Solução 1 (Fixador), Solução 2 (Revelador) e Solução 3 (Corante), em cada uma por 30 s. Após este processo as lâminas foram lavadas em água corrente, secas à temperatura ambiente e cobertas com Permount e lamínula. Os parasitas foram visualizados em microscópio Nikon E600.

3.26 Infecção de células Vero com o mutante de *T. cruzi* para *TcKAP7*

Células Vero (ATCC® Número: CRL-2783™) foram cultivadas em garrafas de 150 cm² contendo meio RPMI suplementado com 5% de soro fetal bovino (GIBCO), penicilina 100 UI/ml, streptomina 10 µg/ml e glutamina 2 mM a 37 ° C com 5% de CO₂. Ao atingirem a confluência (80% a 100%) realizou-se a passagem através de tripsinização e foi feito um inóculo de 1 x 10⁷ células para cada nova garrafa de 150 cm². Após 24 horas, estas células (50% – 70% de confluência) foram infectadas com formas metacíclicas obtidas da diferenciação do mutante de *T. cruzi* para *TcKAP7*, em microplacas de 24 poços, contendo lamínulas de vidro com diâmetro de 13 mm. A cada poço foram adicionadas 2 x 10⁴ células Vero. Após 24 horas de cultivo, as células foram infectadas com tripomastigotas metacíclicos (obtidos do sobrenadante das culturas de *T. cruzi* diferenciados em meio TAU3AAG, sem purificação na coluna de DEAE celulose). A infecção das células Vero foi acompanhada diariamente por microscopia de contraste de fase.

3.27 Análise da função do gene *TbKAP7* de *Trypanosoma brucei* através de ensaios de RNA de interferência

Com o intuito de complementar os estudos da função do gene *TcKAP7* foi utilizada a técnica de RNA de interferência. O uso dessa metodologia compreende uma abordagem alternativa à análise da função gênica para genes ortólogos de *T. brucei* por análises de RNAi, uma vez que a maquinaria de RNAi em *T. cruzi* é inexistente (DA ROCHA *et al.*, 2003). Os resultados podem gerar evidências que estejam relacionadas à funcionalidade dos genes em *T. cruzi*. Esta abordagem foi utilizada neste trabalho para auxiliar no estudo da função do gene *TcKAP7* a partir do ortólogo em *T. brucei* ainda não caracterizado, *TbKAP7*. Os ensaios de RNAi foram realizados em *T. brucei*, cepa 29-13 (WIRTZ *et al.*, 1999) com sistema induzido por tetraciclina utilizando o vetor p2T7-177, ilustrado na figura 12. Este vetor quando transfectado no parasita integra-se aos minicromossomos do *T. brucei*, região de repetições 177 (FOLDYNOVA-TRANTIRKOVA *et al.*, 2005).

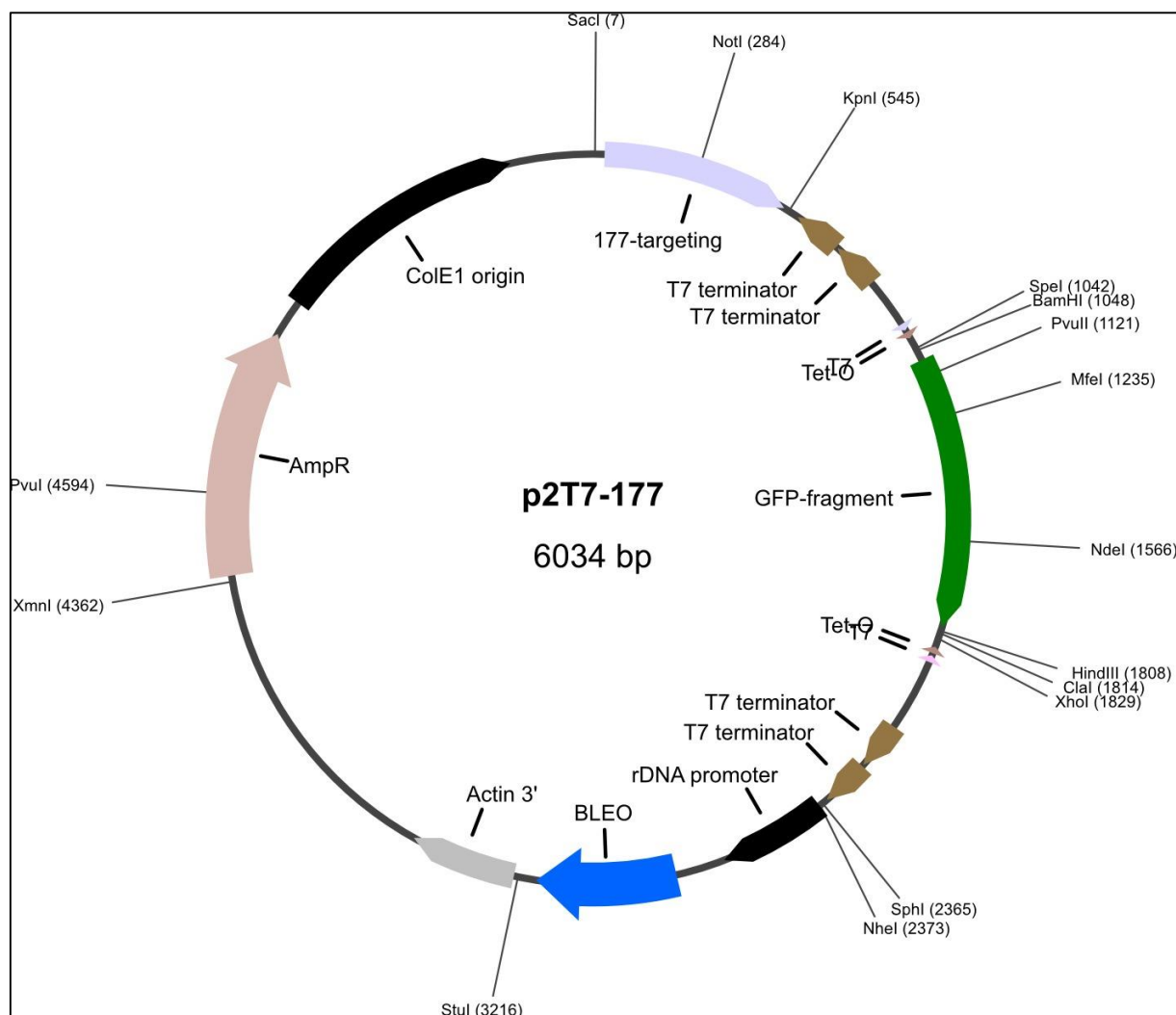


FIGURA 12: MAPA DO VETOR p2T7-177 UTILIZADO PARA ENSAIOS DE RNAi.

LEGENDA: T7 prom: Promotor de T7 RNA Polimerase induzido por tetraciclina. T7 term: Terminador de transcrição. 177: Seqüência repetitiva de 177 pares de bases para alvo de inserção em minicromossomos. BLEO: gene de resistência à fleomicina. GFP: Proteína Green Fluorescent Protein, os sítios para as enzimas de restrição estão indicados. AmpR: gene de resistência à ampicilina (FONTE: WICKSTEAD *et al.*, 2002).

As regiões do mRNA para alvos nos ensaios de RNAi foram escolhidas com o auxílio da ferramenta RNAit da base de dados do Trypanofan - Genômica funcional de *T. brucei* (<http://trypanofan.path.cam.ac.uk/trypanofan/main/>) (REDMOND *et al.*, 2003). Essas regiões foram amplificadas por PCR usando como molde o DNA total de *T. brucei* (100 ng/reação), 10 pmol dos *primers*, listados na tabela 3, 200 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, tampão *Taq* DNA polimerase 1x

(Invitrogen) e 2,5 unidades de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). A reação foi aquecida por 4 min a 94 °C e então submetida a 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 55 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 1 min. Os primers utilizados apresentam sítio para as enzimas de restrição *Bam*HI (F) ou *Hind*III (R). Os produtos de PCR foram purificados por extração com fenol-clorofórmio e digeridos com as referentes enzimas.

QUADRO 3 - RELAÇÃO DOS PRIMERS UTILIZADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO DO GENE *TbKAP7*

KAP7RNAiF	AAAG GGATCC CTAACCTAACCTGCAGGGTCTCTCG
KAP7RNAiR	GCG AAGCTT TTTGTTCCCTTTACAAACGCCC

Os sítios das enzimas de restrição *Bam*HI (GGATCC) e *Hind*III (AAGCTT) adicionados aos *primers* estão em negrito.

As clonagens foram confirmadas por PCR de colônia e os plasmídeos foram purificados pelo kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). Após purificação, 10 µg dos plasmídeos foram linearizados com a enzima *Not*I, conforme descrito pelo fabricante. O DNA foi precipitado e ressuspensão em 50 µl de meio de eletroporação ZPFM para transfecção do *T. brucei*.

Para cada transfecção foi utilizado um total de 4×10^7 parasitas em fase logarítmica de crescimento. Os parasitas foram obtidos por centrifugação (5.000 x g por 10 min a 4 °C) lavados em meio ZPFM e ressuspensos em 500 µl do mesmo meio. A transfecção foi feita em cubetas de eletroporação (4 mm), usando o eletroporador da BioRad (GenePulser II Electroporator). As condições utilizadas foram dois pulsos de 1.600 V e 25 µF. Os parasitas foram então transferidos para garrafas contendo meio SDM-79, SFB 10 %, higromicina 50 µg/ml e G418 15 µg/ml. A seleção dos parasitas transfectados foi através da adição de 5µg/mL de fleomicina, resistência conferida pelo vetor p2T7-177, após 24 horas de cultivo. O tempo para seleção foi entre duas e três semanas.

3.27.1 Indução do RNA dupla fita

A indução da expressão de RNA dupla fita referente à porção do gene *TbKAP7* clonado no plasmídeo p2T7-177 deu-se pela adição de tetraciclina 2 µg/ml a uma cultura transfectada de *T. brucei* em fase de crescimento exponencial (~2 x 10⁶ parasitas/ml). Nos dias que se seguiram, 1µg/ml de tetraciclina foi adicionada diariamente às culturas. A observação dos efeitos na curva de crescimento causada por RNAi em *T. brucei*, foi realizada ao longo de uma semana com a contagem de células e adição diária de tetraciclina 1 µg/ml.

4. RESULTADOS

4.1 Clonagem e caracterização do gene *TcKAP7*

A região codificante do gene *TcKAP7* (ID: Tc00.1047053508719.50) foi obtida a partir do banco de dados do genoma do *T. cruzi* disponível no portal da internet www.genedb.org e amplificada por PCR com os primers descritos no item 3.7.

No genoma do *T. cruzi* cepa CL Brener (EL-SAYED *et al.*, 2005) foram identificados dois haplótipos do gene *TcKAP7*, que foram denominados, neste trabalho, de haplótipo A (Tc00.1047053508719.50) e haplótipo B (Tc00.1047053509793.20). Neste trabalho foi utilizado o gene *TcKAP7* proveniente da cepa Dm28c de *T. cruzi*. Este gene apresenta uma região codante de 747 pb e codifica uma proteína de 27,6 kDa, assumindo que o primeiro ATG após a sequência do mini-éxon seja usada na iniciação da tradução.

A figura 13 abaixo mostra o alinhamento de *TcKAP7* das cepas CL Brener e Dm28c.

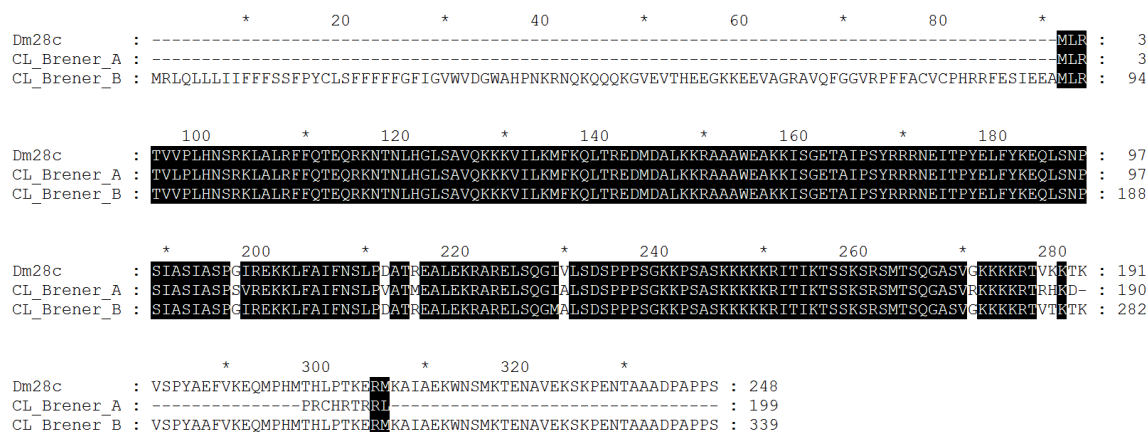


FIGURA 13 - COMPARAÇÃO ENTRE AS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DEDUZIDAS DO GENE *KAP7* DE *T. cruzi* Dm28C E DOS HAPLÓTIPOS DE CL BRENER

LEGENDA: As posições com aminoácidos idênticos em todas as sequências estão coloridas em preto.

Embora o gene *TcKAP7* não possua grande identidade com os com genes ortólogos em *Trypanosoma brucei*, *TbKAP7* (714 pb) (Tb10.6k15.1470), *Leishmania major*, *LmKAP7* (1044 pb) (LMJF_36_5840), *Leishmania infantum* *LiKAP7* (1044 pb) (LINJ_36_6090) e *Leishmania braziliensis* *LbKAP7* (1038 pb) (LBRM_35_0010), cujos genomas também foram seqüenciados (BERRIMAN *et al.*, 2005; IVENS *et al.*, 2005; PEACOCK *et al.*, 2007), as seqüências de aminoácidos das respectivas proteínas deduzidas a partir desses genes, ainda compartilham certo grau de similaridade entre si (FIGURA 14). Na tabela 4 pode-se visualizar o percentual de identidade entre as proteínas KAP7 dos tripanossomatídeos que possuem o genoma seqüenciado.

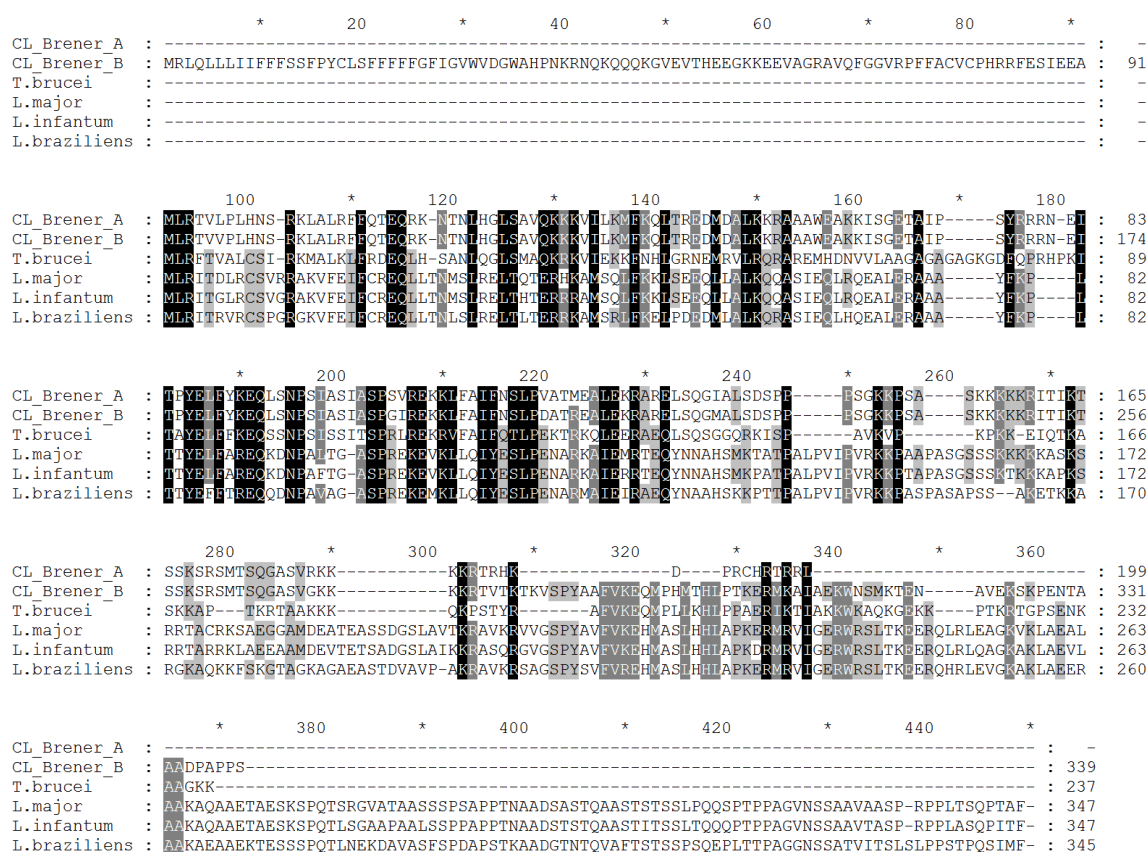


FIGURA 14: COMPARAÇÃO ENTRE AS SEQÜÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DEDUZIDAS DO GENE KAP7 EM DIFERENTES TRIPANOSOMATÍDEOS

LEGENDA: Em preto encontram-se os resíduos de aminoácidos idênticos em todas as seqüências e em cinza os resíduos conservados na maioria delas.

QUADRO 4 - PERCENTUAL DE IDENTIDADE ENTRE AS PROTEÍNAS KAP7 NOS TRIPANOSSOMATÍDEOS COM O GENOMA SEQUENCIADO

	1	2	3	4	5	6	7
1: LbKAP7	100.00	69.77	68.31	29.07	33.74	33.33	28.35
2: LmKAP7	69.77	100.00	88.18	28.63	34.02	33.61	27.69
3: LiKAP7	68.31	88.18	100.00	27.31	32.38	32.38	26.15
4: TbKAP7	29.07	28.63	27.31	100.00	46.09	46.09	41.85
5: TcKAP7_Dm28c	33.74	34.02	32.38	46.09	100.00	98.39	90.45
6: TcKAP7_CL_B	33.33	33.61	32.38	46.09	98.39	100.00	90.45
7: TcKAP7_CL_A	28.35	27.69	26.15	41.85	90.45	90.45	100.00

Os valores foram obtidos pelo alinhamento utilizando a ferramenta Clustal2.1.

Mesmo apresentando pouca identidade e variação de tamanho, alguns dados do genoma sugerem que esses genes são ortólogos entre si. Pode-se perceber uma sintenia entre seus loci nas várias espécies de tripanosomatídeos (Cavalcanti *et al.*, 2009) (FIGURA 15).

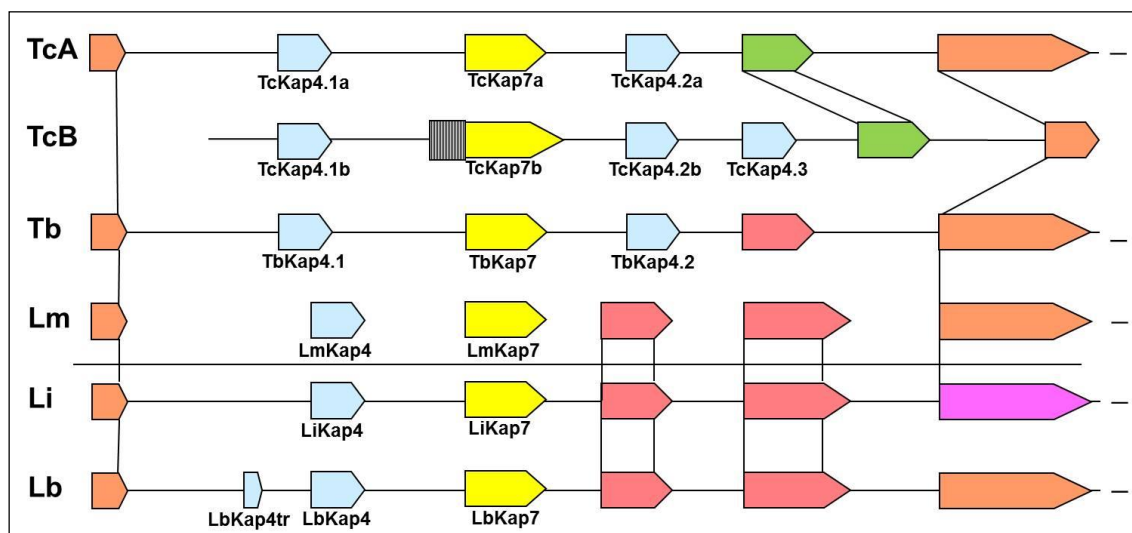


FIGURA 15- SINTENIA DE *TcKAP7* COM OUTROS TRIPANOSOMATÍDEOS

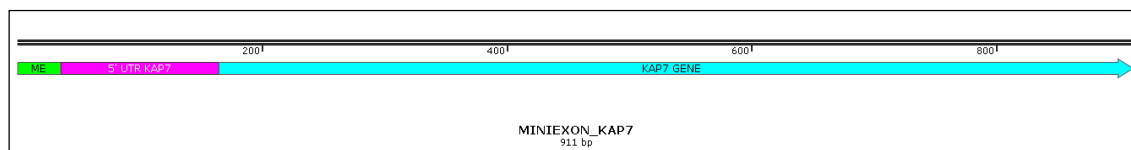
LEGENDA: Os dois contigs de *TcKAP7* (TcA e TcB) estão representados nesta figura, juntamente com os contigs de outros tripanosomatídeos (Tb= *T. brucei*; Lm= *L. major*; Li= *L. infantum* e Lb= *L. brasiliensis*), mostrando que *KAP7*, representado pela cor amarela, apresenta uma sintenia entre seus loci em todas as espécies mostradas, sendo flanqueado pelo gene *KAP4* em *T. cruzi* e *T. brucei*, representado em azul. Portanto em *L. major*, *L. infantum* e *L. brasiliensis* ao lado direito de *KAP7* está o gene de uma proteína hipotética, representado pela cor vermelha e ao lado esquerdo, encontra-se o gene da *KAP4*, representado em azul, como mencionado anteriormente.

FONTE: CAVALCANTI *et al.*, 2009.

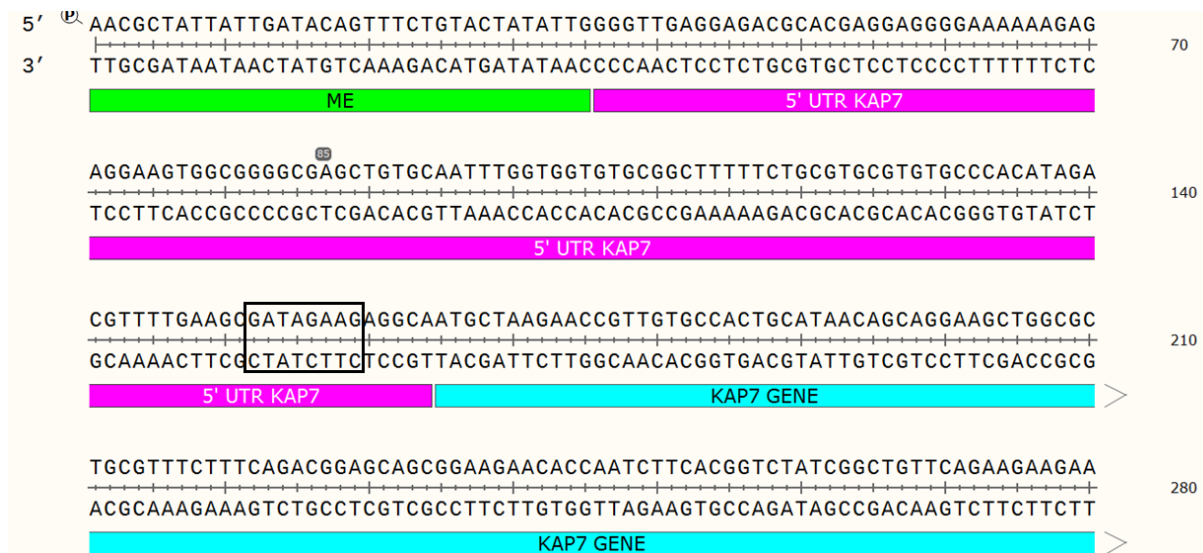
A expressão de vários genes mitocondriais de *C. fasciculata* e *L. major* é regulada durante o ciclo celular, em parte por uma sequência consenso [(C/A)AUAGAA(G/A)] presente nas regiões 5' e 3'-UTR dos respectivos mRNAs (BROWN & RAY, 1997; MAHMOOD *et al.*, 1999; MAHMOOD & RAY, 1998; PASION *et al.*, 1996; ZICK *et al.*, 2005).

Assim resolvemos caracterizar a região 5'-UTR do transcrito *TcKAP7* na tentativa de identificar sinais com identidade com aqueles encontrados em *C. fasciculata*. Na figura 16 está representada a região 5'-UTR do transcrito *TcKAP7*, com a sequência parcial do mini-exon, proveniente do *primer* usado na técnica de RT-PCR, bem como parte da região codificante do gene. O mini-exon está situado a 129 bases a jusante do início da região codificante do transcrito *TcKAP7* e define, portanto, uma região 5'-UTR de 168 bases, considerando que o tamanho do mini-exon é de 39 bases. A análise da região 5'-UTR mostrou um elemento com características muito semelhantes aquele envolvido na regulação de genes em *C. fasciculata* (sequência (G)ATAGAA(G), mostrada no retângulo preto na FIGURA 16B), sugerindo que *TcKAP7* seja regulada durante o ciclo celular.

A.



B.

FIGURA 16: CARACTERIZAÇÃO DA REGIÃO 5'-UTR DO TRANSCRITO *TcKAP7*

LEGENDA: A. Esquema geral da localização do mini-exon de *TcKAP7* e B. Localização específica do mini-exon de *TcKAP7*. O mini-exon de *TcKAP7* (sequência parcial, em verde) está localizado a 129 pb da região codante (representada, em parte, pela cor azul). A região 5'UTR do transcrito *Tckap7* está representada na cor rosa. A possível sequência consenso de regulação durante o ciclo celular está indicada no retângulo preto.

4.2 Expressão da proteína TcKAP7 em *T. cruzi*

Formas epimastigotas foram transfectadas com o plasmídeo pNEO3XFLAG contendo o gene *TcKAP7* (pNEO_KAP7_3xFLAG.). A expressão da proteína TcKAP7-FLAG foi analisada por ensaio de *western blot*. Os resultados mostraram que a expressão da proteína TcKAP7-FLAG foi satisfatória, correspondendo ao tamanho esperado (FIGURA 17), a qual foi confirmada pela reatividade do anticorpo monoclonal específico para as etiquetas FLAG (anti-FLAG).

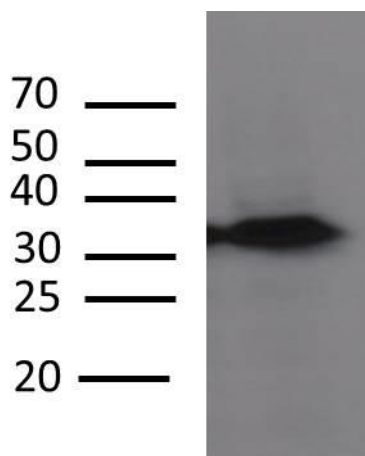


FIGURA 17: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA DE FUSÃO TcKAP7-FLAG EM FORMAS EPIMASTIGOTAS DE *T. CRUZI*.

4.3 Localização celular de TcKAP7 através de ensaio de imunofluorescência

Para verificar a localização celular de TcKAP7 foi realizado o ensaio de imunofluorescência. Como não foi possível a obtenção do anticorpo com alto título contra a proteína recombinante TcKAP7, neste ensaio foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-FLAG, que reconhece a etiqueta FLAG, a qual está fusionada a proteína TcKAP7.

Nessa figura pode-se observar que a proteína de fusão acumula-se na região dos pólos do cinetoplasto das formas epimastigotas do *T. cruzi* (FIGURA 18), indicando que TcKAP7, uma proteína tipo histona H1, está realmente associada com o kDNA do parasita.

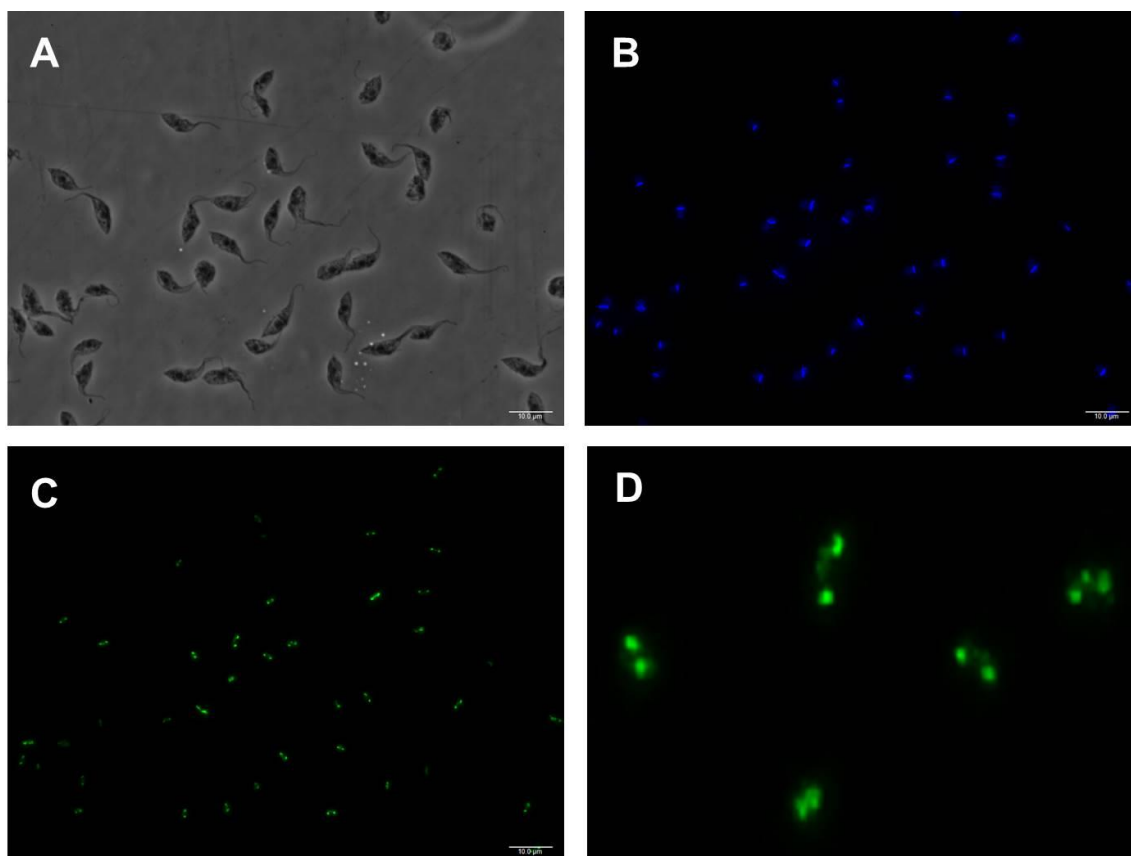


FIGURA 18: IMUNOLOCALIZAÇÃO DE TcKAP7 EM EPIMASTIGOTAS DE *T. CRUZI*.

LEGENDA: A: contraste interferencial diferencial (DIC). B: Hoechst, marcando o núcleo e o cinetoplasto. C: fluorescência, mostrando a localização de TcKAP7 mais intensa na região dos polos do cinetoplasto dos protozoários. D: Aumento de C.

4.4 Deleção do gene *TcKAP7* por nocaute gênico

As técnicas que permitem a remoção de um gene e sua substituição por genes repórteres, através do processo de recombinação, têm sido usadas com sucesso para verificação da função gênica em tripanosomatídeos (MACRAE *et al.*, 2006). O nocaute gênico consiste na inserção de marcadores genéticos de seleção (gene codificando resistência a neomicina ou higromicina, entre outros), flanqueados por seqüências pertencentes ao locus cromossômico de interesse. Através do processo de recombinação homóloga, o marcador pode então substituir o gene que se quer estudar. Desse modo, pode ser possível analisar a função de determinado gene, através das alterações - decorrentes de sua ausência - na fisiologia do parasita. No presente estudo, os genes repórteres que codificam resistência aos

antibióticos G418 e higromicina foram flanqueados por seqüências a montante e a jusante da região codificante do gene *TcKAP7*. As construções foram usadas para transfectar *T. cruzi* e gerar mutantes para o gene *TcKAP7*, a fim de se estudar o efeito que a ausência do gene *TcKAP7* causa no metabolismo do parasita.

Após obtenção de uma população de *T. cruzi* mutante para o gene *TcKAP7* (*kap7::neo/kap7::higro*), resistente a ambos antibióticos, G418 e higromicina B, o DNA desta população foi extraído para análise por PCR e Southern blot, a fim de confirmar a eficiência do nocaute.

4.4.1 Análise por PCR do DNA dos parasitas transfectados com os cassetes UPS-NEO-DOWN e UPS-HIGRO-DOWN

Foram realizadas várias reações de PCR a fim de confirmar a deleção do gene *TcKAP7* do genoma do *T. cruzi* Dm28c e a substituição dos seus alelos pelos genes *neo* e *higro*. As reações de PCR foram feitas com DNA de *T. cruzi*^{*kap7/kap7*} (tipo selvagem) e com DNA de *T. cruzi*^{*kap7::neo/kap7::higro*}, utilizando diversas combinações de *primers* (TABELA 5). Na figura 32 observa-se que o gene *TcKAP7* (747 pb) foi amplificado somente na PCR realizada com DNA de *T. cruzi* tipo selvagem (FIGURA 19 A, canaleta 1), enquanto que os genes *neo* (795 pb) e *higro* (1026 pb) só foram amplificados nas reações que contém DNA da população do *T. cruzi*^{*kap7::neo/kap7::higro*} (FIGURA 19 B, canaletas 2 e 3). Os tamanhos esperados para amplificações usando *primers* externos às construções e os *primers* dos genes de resistência foram identificados no gel de agarose, indicando que os cassetes se integraram corretamente no locus do gene *TcKAP7* (FIGURA 19 B, canaletas 4 a 7). Um esquema da localização dos *primers* utilizados nas reações de PCR pode ser visualizado na figura 19 C.

QUADRO 5 – COMBINAÇÕES DE PRIMERS UTILIZADOS NA PCR PARA CONFIRMAR O NOCAUTE DE *TcKAP7*

	Pares de primers	Tamanho esperado (pb)
1	KAP7F + KAP7R	747
2	NEOF + NEOR	795

3	HIGROF + HIGROR	1026
4	EXTF + NEOR	1410
5	EXTF + HIGROR	1634
6	NEOF + EXTR	1358
7	HIGROF + EXTR	1360

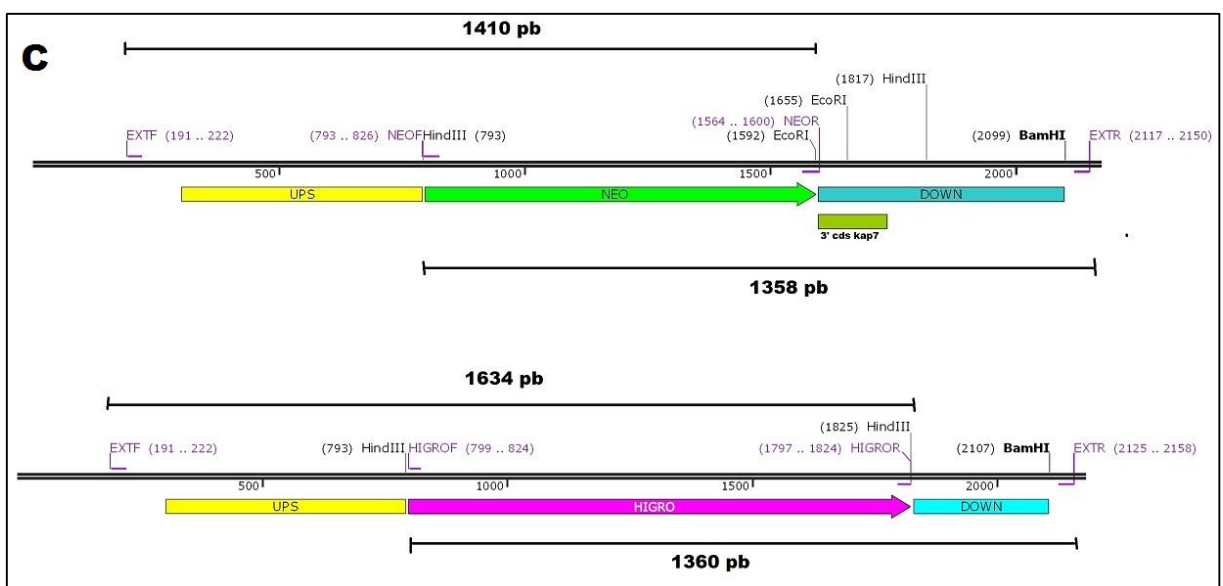
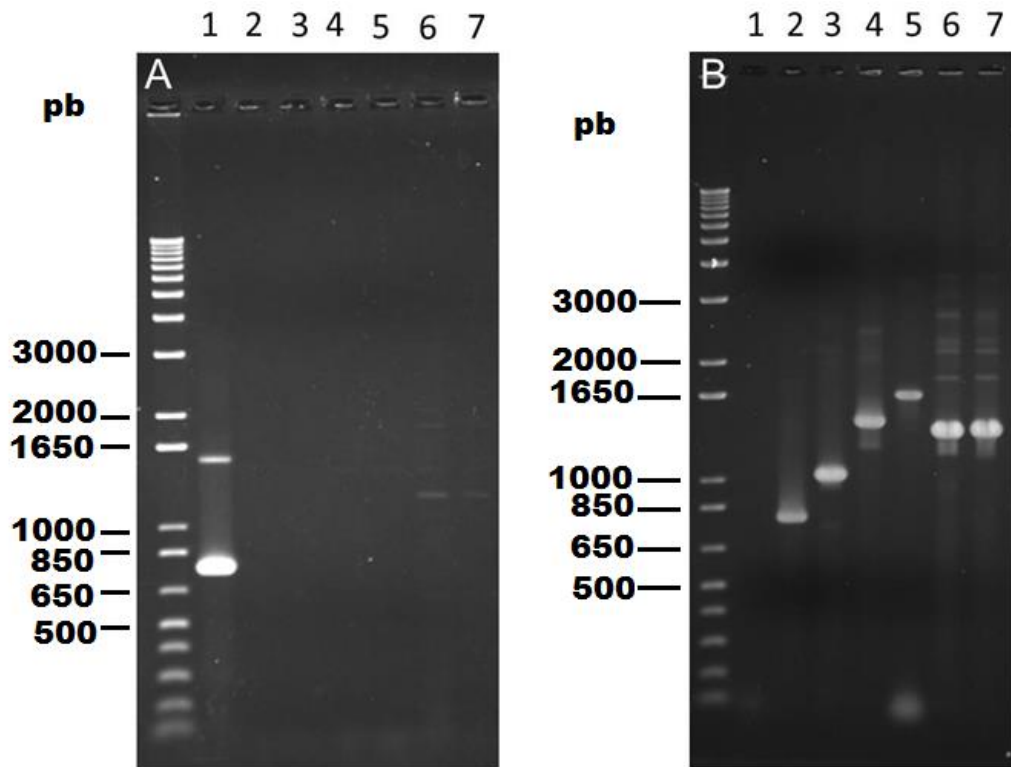


FIGURA 19: ENSAIOS DE PCR UTILIZANDO DNA DE *T. cruzi* ^{kap7/kap7} (WT) E *T. cruzi* ^{kap7::neo/kap7::higro} (NO) COM DIFERENTES PRIMERS

LEGENDA: 1. KAP7F + KAP7R, 2. NEOF + NEOR (795 pb), 3. HIGROF + HIGROR (1026 pb), 4. EXTF + NEOR (1410 pb), 5. EXTF + HIGROR (1634 pb), 6. NEOF + EXTR (1358 pb) e 7. HIGROF + EXTR (1360 pb). No quadro A encontram-se as PCRs realizadas com DNA de *T. cruzi* ^{kap7/kap7} (WT) e no quadro B encontram-se as PCRs realizadas com DNA de *T. cruzi* ^{kap7::neo/kap7::higro} (NO). No quadro C está um esquema da localização dos primers utilizados.

4.4.2 Análise da organização dos genes *TcKAP7*, *neo* e *higro* por ensaio do tipo Southern blot

Neste ensaio foi utilizado DNA total extraído de *T. cruzi* ^{kap7/kap7} (tipo selvagem) e *T. cruzi* ^{kap7::neo/kap7::higro} (duplo nocaute). Foram utilizadas três sondas: (1) Um fragmento do gene *TcKAP7* (primeiros 598 pb da CDS), (2) o gene *neo* e (3) o gene *higro*. O DNA total das duas amostras foi digerido com a enzima de restrição *HindIII*. O padrão de digestão desta enzima pode ser visualizado na figura 20. De acordo com o mapa de restrição, a inserção do cassete neo no locus KAP7 geraria um fragmento *HindIII*/*HindIII* de 1024 pb, enquanto a inserção do cassete higro geraria um fragmento de 1032 pb, cujos tamanhos são diferentes do fragmento *HindIII*/*HindIII* do locus original (1776 pb). As hibridizações mostram bandas compatíveis com os tamanhos dos fragmentos *HindIII*/*HindIII* esperados para cada situação acima (FIGURA 21). Podemos observar que a sonda KAP7 somente reconhece uma banda de tamanho esperado apenas no DNA do parasita selvagem (canaleta 1, FIGURA 21), enquanto que bandas correspondentes aos genes neo e higro, somente aparecem no DNA do mutante KAP7 (canaleta 2, FIGURA 21).

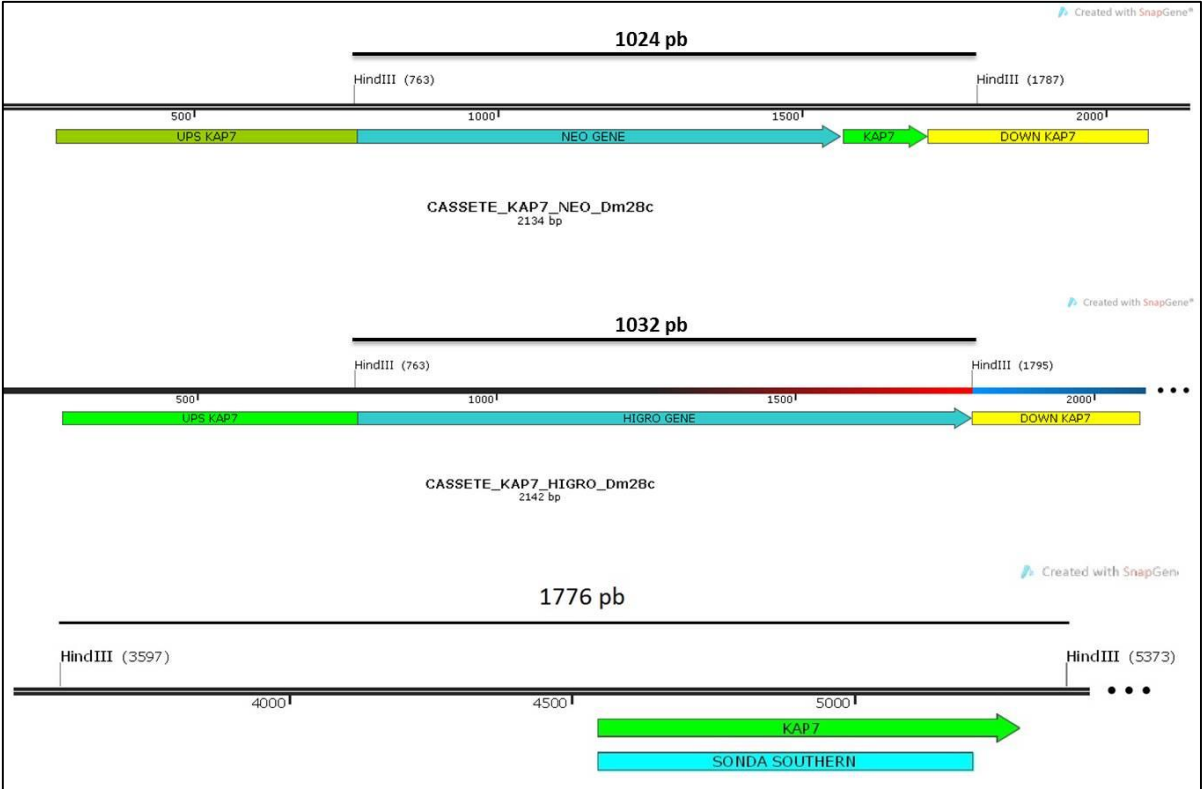


FIGURA 20 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS SÍTIOS DA ENZIMA *Hind*III NO LOCUS DO GENE KAP7 DE *T. cruzi* CL Brener

LEGENDA: Este esquema representa esquematicamente, em escala, os genes kap3, neo e higo, as regiões upstream e downstream e os sítios de clivagem da enzima *Kpn*I.

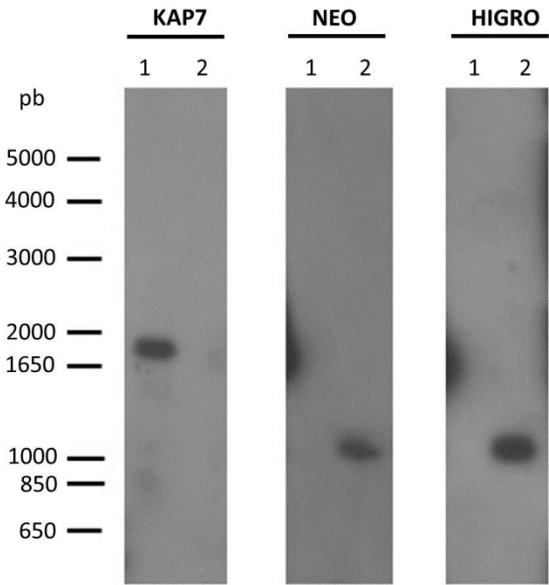


FIGURA 21: ANÁLISE DA ORGANIZAÇÃO DOS GENES *TCKAP7*, *NEO* E *HIGRO* POR ENSAIO DO TIPO SOUTHERN BLOT

LEGENDA: A. Autorradiograma e B. Padrões dos fragmentos obtidos da digestão do DNA com a enzima de restrição *Hind*III. Foram utilizadas três sondas: TcKAP7, neomicina e higromicina. 1) DNA de *T. cruzi*^{kap7/kap7} (tipo selvagem) e 2) *T. cruzi* ^{kap7::neo/kap7::higo} (duplo nocaute).

4.5 Comparação da expressão do gene *TcKAP7* por western blot

O antisoro contra a proteína TcKAP7, obtido após imunização dos camundongos, foi utilizado em ensaio do tipo western blot, para avaliar se *TcKAP7* ainda estava sendo expresso no *T. cruzi* após o nocaute gênico.

O que se observou foi, novamente como esperado, que a proteína TcKAP7 não é mais expressa no *T. cruzi* *kap7::neo/kap7::higro* (figura 22). Pode-se observar a presença de TcKAP7 (aprox.. 28 kDa) no extrato das formas epimastigotas de *T. cruzi* *kap7/kap7* (figura 22A), mas não no extrato de epimastigotas de *T. cruzi* *kap7::neo/kap7::higro* (figura 22B).

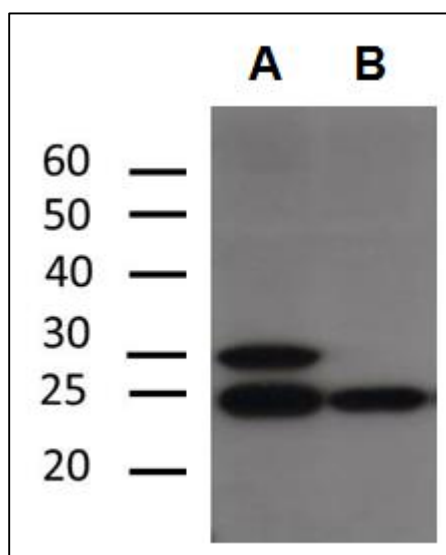


FIGURA 22: COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE *TcKAP7* POR WESTERN BLOT

LEGENDA: Imunoblot de extratos de epimastigotas de *T. cruzi* *kap7/kap7* (A) e de *T. cruzi* *kap7::neo/kap7::higro* (B) reagidos com anti-TcKAP7.

4.6 Análise da morfologia e da ultraestrutura do cinetoplasto do mutante de *T. cruzi* para *TcKAP7*

Sabendo-se que TcKAP7 está associada ao cinetoplasto e pode estar envolvida na compactação do kDNA do *T. cruzi*, como foi mostrado para as KAPs de *Crithidia fasciculata* (XU & RAY, 1993; XU et al., 1996; HINES & RAY, 1998); sua ausência poderia levar a alteração na estrutura do DNA mitocondrial dos parasitas nocauteados. Portanto, o primeiro passo foi verificar se havia alterações na

morforlogia do parasita. Formas epimastigotas do mutante de *T. cruzi*, foram analisadas ao microscópio óptico, após coloração. Como pode ser observado na figura 23, epimastigotas do mutante de *T. cruzi* para *TcKAP7* apresentam uma morfologia fusiforme com o cinetoplasto característico em forma de barra localizado anteriormente ao núcleo, não se evidenciando portanto nenhuma alteração em relação à morfologia dos parasitas do tipo selvagem.

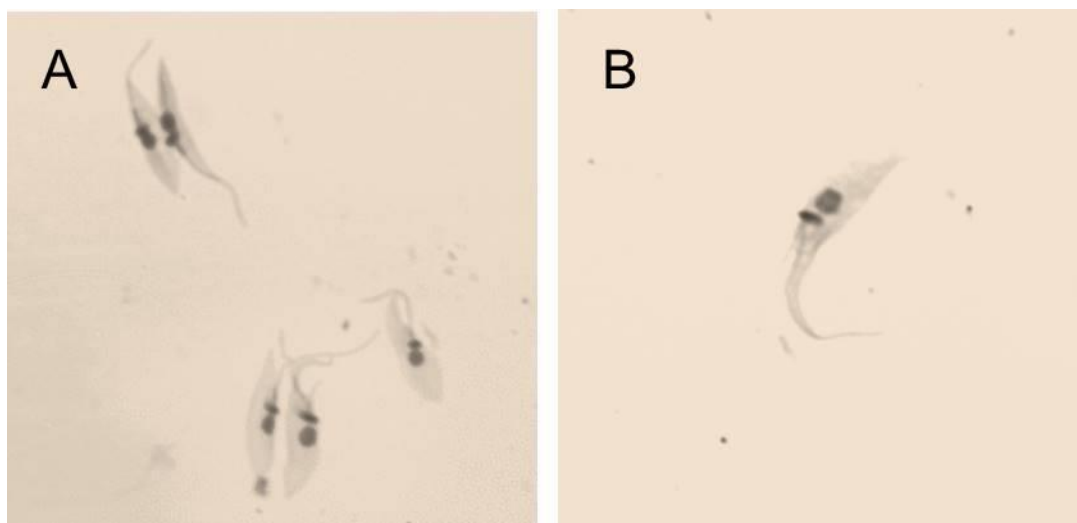


FIGURA 23 - COLORAÇÃO PELO MÉTODO PANÓTICO RÁPIDO, DOS PARASITAS EPIMASTIGOTAS NOCAUTEADOS

LEGENDA: A) Formas epimastigotas. B) Forma epimastigota em maior aumento.

Formas epimastigotas de parasitas do tipo selvagem e nocauteados foram então analisados pela técnica de microscopia eletrônica de transmissão, para visualizar com mais detalhe o cinetoplasto e verificar se sua estrutura estava alterada pela ausência da *TcKAP7* (FIGURA 24). A figura 24A, mostra um corte ultrafino de um epimastigota de *T. cruzi* do tipo selvagem, que apresenta o cinetoplasto compacto e em forma de bastão, característico de formas epimastigotas, sem nenhuma alteração aparente. O mesmo pode ser visto na figura 24B, para o epimastigota de *T. cruzi* nocauteado. A disposição, estrutura e aspecto do cinetoplasto de ambos os parasitas, selvagem e nocauteado, não apresentaram nenhuma diferença entre si, mostrando que mesmo após o nocaute da *KAP7*, a estrutura do cinetoplasto permanece aparentemente inalterada.

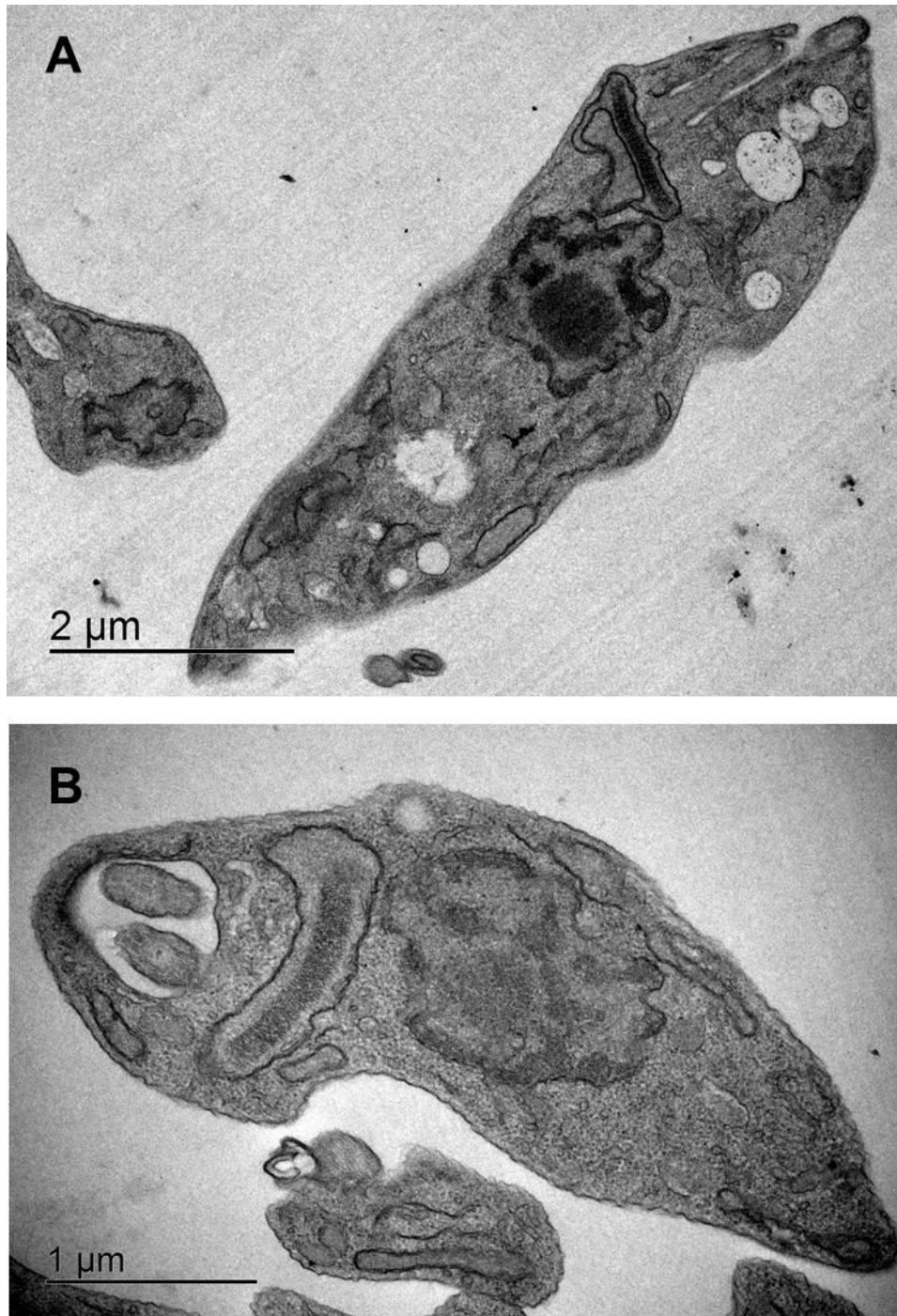


FIGURA 24: COMPARAÇÃO ENTRE A ULTRAESTRUTURA DO CINETOPLASTO DO *T. cruzi* DM28C TIPO SELVAGEM (A) E DO MUTANTE DE *T. cruzi* PARA *TcKAP7* (B) POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

4.7 Multiplicação, diferenciação e infectividade do mutante de *T. cruzi* para *TcKAP7*

Os parasitas mutantes foram analisados a fim de verificar se alterações na estrutura do kDNA, pela ausência de KAP7, não estavam levando a alterações na fisiologia do parasita, alterando sua multiplicação, diferenciação e infectividade.

Inicialmente foi analisado o perfil da curva de crescimento das formas epimastigotas. Observou-se que não havia diferença na curva de crescimento dos parasitas nocauteados em relação ao parasita selvagem (FIGURA 25).

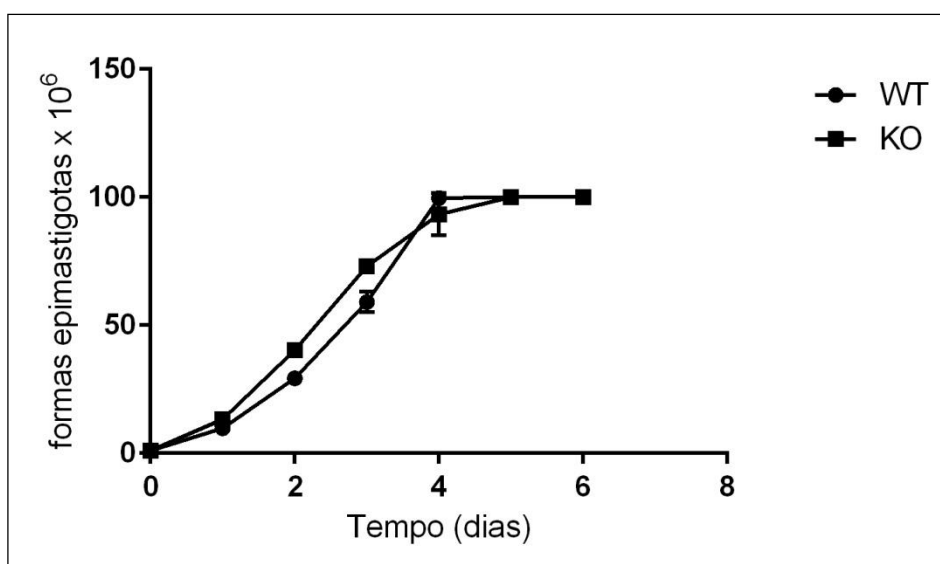


FIGURA 25: CURVA DE CRESCIMENTO DO MUTANTE DE *T. cruzi* PARA *TcKAP7* (KO) E DO *T. cruzi* Dm28c SELVAGEM (WT)

LEGENDA: Curva de crescimento do mutante de *T. cruzi* para *TcKAP7* (■) e do *T. cruzi* Dm28c (●).

Em seguida, os parasitas nocauteados foram analisados quanto a sua capacidade de diferenciação em tripomastigotas metacíclicos. Foram realizadas contagens diferenciais em câmara de Neubauer, a partir do sobrenadante da metaciclogênese, a cada 24 h após a incubação das células em meio TAU3AAG, durante um período de 3 dias (72 h). A partir dessas contagens foram construídas curvas com a contagem do número de metacíclicos ao longo dos três dias (FIGURA 26).

Nenhuma alteração foi observada quando os parasitas nocauteados foram submetidos ao processo de metaciclogênese *in vitro*. Ou seja, pode-se afirmar que

mesmo após o nocaute do gene *TcKAP7* as formas epimastigotas do parasita conseguem se diferenciar em formas metacíclicas.

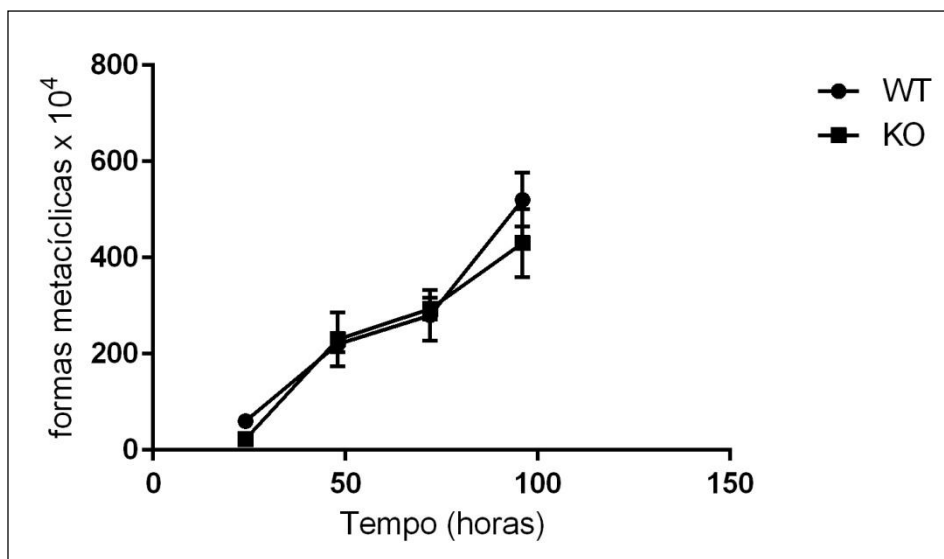


FIGURA 26: METACICLOGÊNESE *IN VITRO* DE *T. cruzi* Dm28c TIPO SELVAGEM E *T. cruzi* NOCAUTEADO.

LEGENDA: Metaciclogênese *in vitro* de *T. cruzi* Dm28c tipo selvagem (●) e *T. cruzi* nocauteado (■)

Uma vez que os parasitas nocauteados foram capazes de se diferenciar de epimastigota a tripomastigota metacíclico, resolveu-se investigar se estes eram capazes de infectar células *in vitro*. Foi possível perceber as formas amastigotas dentro de células VERO em cultura, mostrando que o parasita não perdeu sua capacidade de infecção (dados não mostrados). Assim, pode-se concluir que além de sofrer diferenciação, os mutantes de *T. cruzi* para *KAP7* também mantiveram sua capacidade de infecção.

4.8 Análise da função do gene *KAP7* de *Trypanosoma brucei* através de ensaios de RNA de interferência

Para averiguar a importância da proteína TcKAP7 na biologia do parasita, recorreremos a ensaios de RNA de interferência (RNAi), já que existe uma alta similaridade entre TcKAP7 e seu ortólogo em *Trypanosoma brucei*.

A via de RNA de interferência consiste em um mecanismo de silenciamento gênico que para a célula funciona como sistema de defesa. O mecanismo inicia-se através da expressão de um RNA dupla fita (dsRNA) contendo uma sequência complementar ao gene de interesse. Este dsRNA será então clivado em pequenos fragmentos de cerca de 22 a 25 nucleotídeos através da atividade de uma ribonuclease do tipo III, denominada Dicer. Estes pequenos RNAs serão direcionados e permanecerão unidos a um complexo proteico denominado RISC ("RNA-Induced Silencing Complex"). Nesse complexo, os pequenos RNAs de interferência (siRNA), ligam-se por complementaridade ao RNA mensageiro do gene a ser inativado, guiando-os para degradação pelas nucleases presentes no complexo, impedindo a síntese da respectiva proteína (ULLU *et al*, 2002). O vetor utilizado para promover o silenciamento do gene *TbKAP7* foi o p2T7-177. Este plasmídeo integra-se aos minicromossomos do *T. brucei*, região de repetições 177 (FOLDYNOVA-TRANTIRKOVA *et al*, 2005). Este vetor apresenta dois promotores de polimerase em oposição, induzíveis por tetraciclina, flanqueando a sequência de interesse. Desta forma, são geradas duas moléculas de mRNA que pareadas, formam a molécula de RNA fita dupla capaz de induzir a maquinaria de degradação. A indução da inibição de *TbKAP7* através de RNAi levou a uma diminuição da multiplicação celular do parasita a partir do quarto dia do experimento (FIGURA 27).

Os resultados obtidos neste ensaio mostraram que a participação da *TbKAP7* no metabolismo do *T. brucei* é essencial, já que o silenciamento do gene *TbKAP7* levou à redução da proliferação celular do parasita.

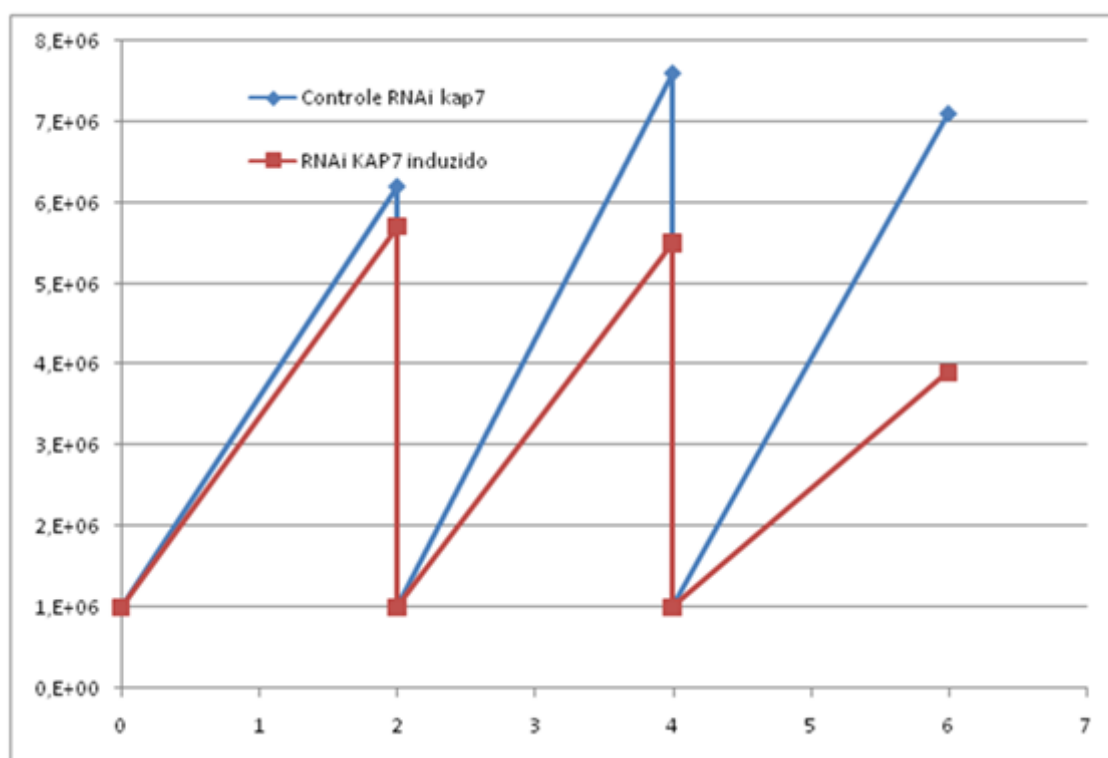


FIGURA 27: RNAi DE *TbKAP7* INIBE O CRESCIMENTO DAS FORMAS PROCÍCLICAS DE *T. brucei*.

LEGENDA: Curva de crescimento de linhagem celular de RNAi de *TbKAP7* em *T. brucei* induzido por tetraciclina. As células foram diluídas a uma densidade celular inicial de 1×10^6 ml na presença e ausência de tetraciclina. As densidades celulares foram determinadas pela contagem de células a intervalos de 24 horas durante oito dias após início de adição de tetraciclina. A linha com quadrados mostra a curva de crescimento celular na presença de tetraciclina (+TET). A linha com losangos mostra a curva de crescimento celular na ausência de tetraciclina (- TET).

4.9 Caracterização estrutural de TcKAP7

4.9.1 Produção recombinante de TcKAP7

O cultivo de *E. coli* BL-21(DE3) STAR contendo o plasmídeo pET28a-TcKAP7 foi feito em meio LB a 37 °C, com a indução da expressão realizada a uma densidade ótica de DO_{600} de 0,8 com a adição de 0,5 mM de ITPG, durante a noite a 37 °C.

As células foram recuperadas por centrifugação, ressuspensas, sonicadas e centrifugadas para a purificação de TcKAP7 através da cromatografia de afinidade em resina de Ni-NTA (Figura 28A). Foi possível obter grande quantidade de

amostra, com grau de pureza alto, como visualizado através de análise por SDS-PAGE (Figura 28B).

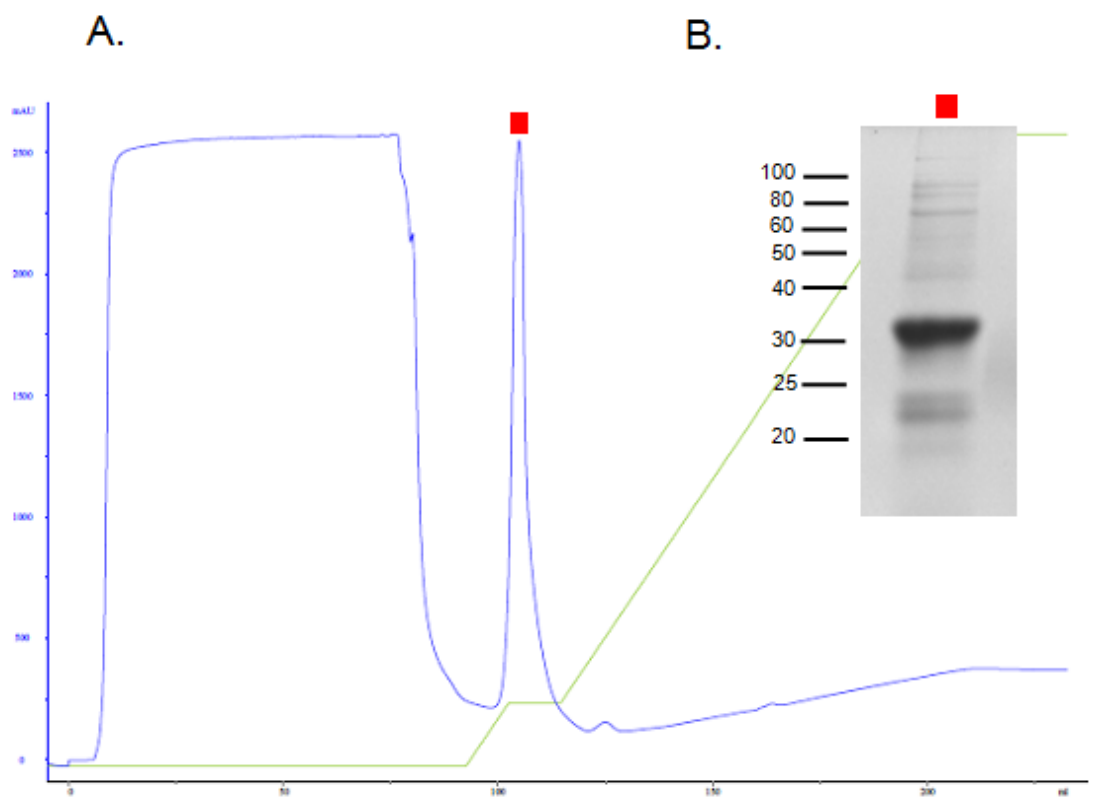


FIGURA28: PURIFICAÇÃO DE TCKAP7 ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE.

LEGENDA: A) Cromatograma de afinidade. B) SDS-PAGE da cromatografia de afinidade. Os números à esquerda da figura representam os tamanhos das bandas do marcador de massa molecular (Benchmark) (Invitrogen) e P: banda correspondente à TcKAP7 purificada. Caixa em vermelho indica o pico que corresponde à fração no SDS-PAGE.

Devido à presença de bandas com possíveis contaminantes, as frações que continham a proteína de interesse foram submetidas à purificação por cromatografia de troca iônica, onde a purificação é realizada baseada na afinidade por cargas entre as proteínas e a resina.

Para esta purificação, utilizou-se a coluna SP Hitrap (GE Healthcare Life Sciences) que é uma coluna de carga negativa. Essa resina foi escolhida, pois o pH do tampão em que se encontrava TcKAP7 era menor que o pI da proteína. Nessas condições, a carga superficial de TcKAP7 é positiva. Para favorecer a interação TcKAP7 e resina, foi feita uma diluição de TcKAP7 para retirada de NaCl. A eluição da proteína foi realizada com um gradiente segmentado de tampão B para

cromatografia de troca iônica. TcKAP7 foi eluída com 68 % do tampão B (FIGURA 29).

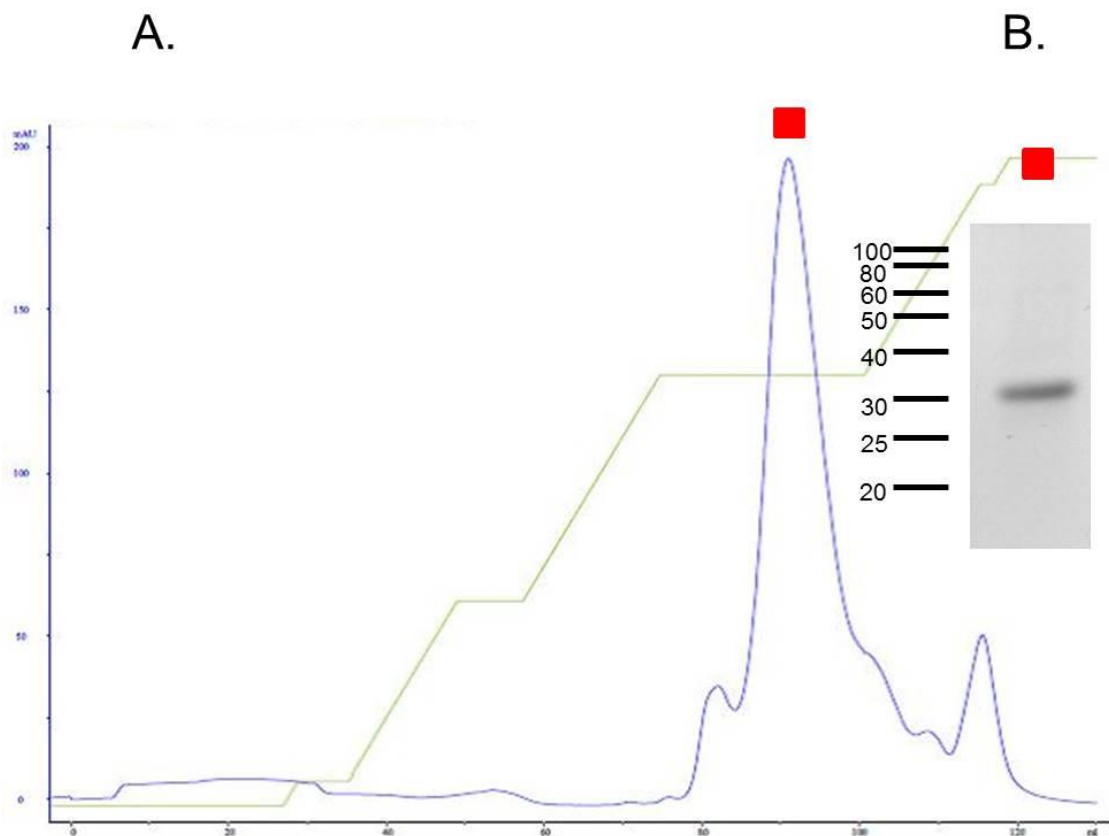


FIGURA 29: PURIFICAÇÃO DE TCKAP7 ATRAVÉS DE CROMATOLOGRAFIA DE TROCA IÔNICA.

LEGENDA: A) Cromatografia de troca iônica. B) SDS-PAGE da cromatografia de troca iônica. Os números à esquerda da figura representam os tamanhos das bandas do marcador de massa molecular (Benchmark) (Invitrogen) e P: banda correspondente à TcKAP7 purificada. Caixa em vermelho indica o pico que corresponde à fração no SDS-PAGE. Curva em azul representa absorbância em 280 nm. Linha em verde indica concentração de tampão B para eluição da amostra.

4.10 Análise do estado oligomérico de TcKAP7

A amostra purificada por troca iônica foi submetida à cromatografia de exclusão molecular, também chamada de gel filtração, que consiste na separação de biomoléculas de acordo com seu tamanho e forma. A coluna neste processo contém um polímero com ligações cruzadas com poros de tamanho definido. As moléculas maiores irão migrar mais rapidamente que as menores, pois não são

capazes de penetrar no interior dos poros da resina, eluindo diretamente da coluna. As moléculas menores, por entrarem pelos poros da resina, e levarem mais tempo percorrendo os poros, são eluídas mais tarde em relação as que são maiores.

Ao comparar o volume de eluição de TcKAP7 com o volume de eluição de proteínas com massa molecular conhecidos (dados não mostrados) foi possível verificar que TcKAP7 parece ser um monômero em solução. Para confirmar esses dados, a mesma amostra foi submetida ao experimento de espalhamento dinâmico de luz (DLS).

O DLS é uma técnica que se estima a distribuição de tamanho das populações de partículas que estão presentes na amostra, permitindo a detecção de agregados proteicos ou de diferentes estados de oligomerização na amostra, indicando heterogeneidade. É importante ressaltar que, para maiores chances de sucesso em ensaios de cristalização a amostra deve encontrar-se monodispersa.

Os dados de DLS mostram que 91.1% da massa de TcKAP7 analisada apresenta um raio hidrodinâmico (R_h) de 3,9 nm, que representa uma massa aparente de 29 kDa (FIGURA 30). Isto é condizente com um monômero, cuja massa teórica seria de aproximadamente 28 kDa (incluindo a cauda de 6 histidinas) de acordo com a predição feita pelo servidor ExPASy ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>). A polidispersividade da amostra foi baixa, indicando que a mesma estava homogênea.

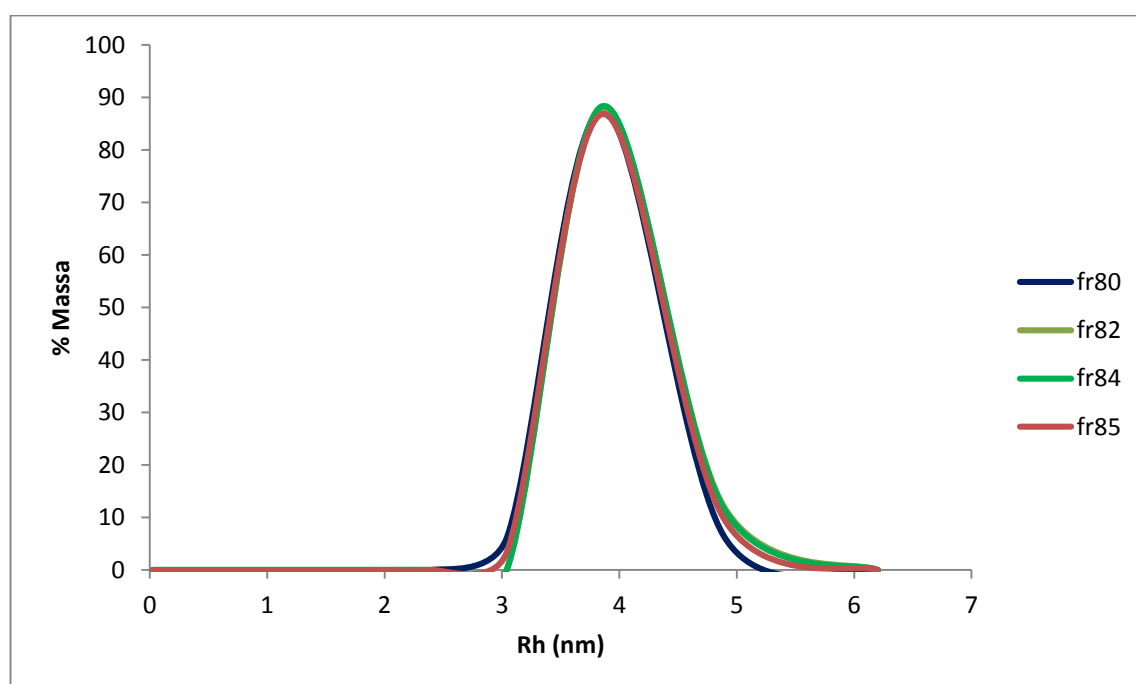


FIGURA 30: ANÁLISE POR DLS DE TcKAP7.

LEGENDA: Análise por DLS de TcKAP7 contendo as frações obtidas na cromatografia de afinidade. As frações 80, 84 e 85 apresentam um raio hidrodinâmico (Rh) de 3,9 nm.

Além disso, também foram obtidas informações sobre o envelope de TcKAP7, a partir dos dados coletados através da técnica de SAXS, mostrando que o raio de giro (R_g) do envelope de TcKAP7 está de acordo com o estimado por DLS (FIGURA 31).

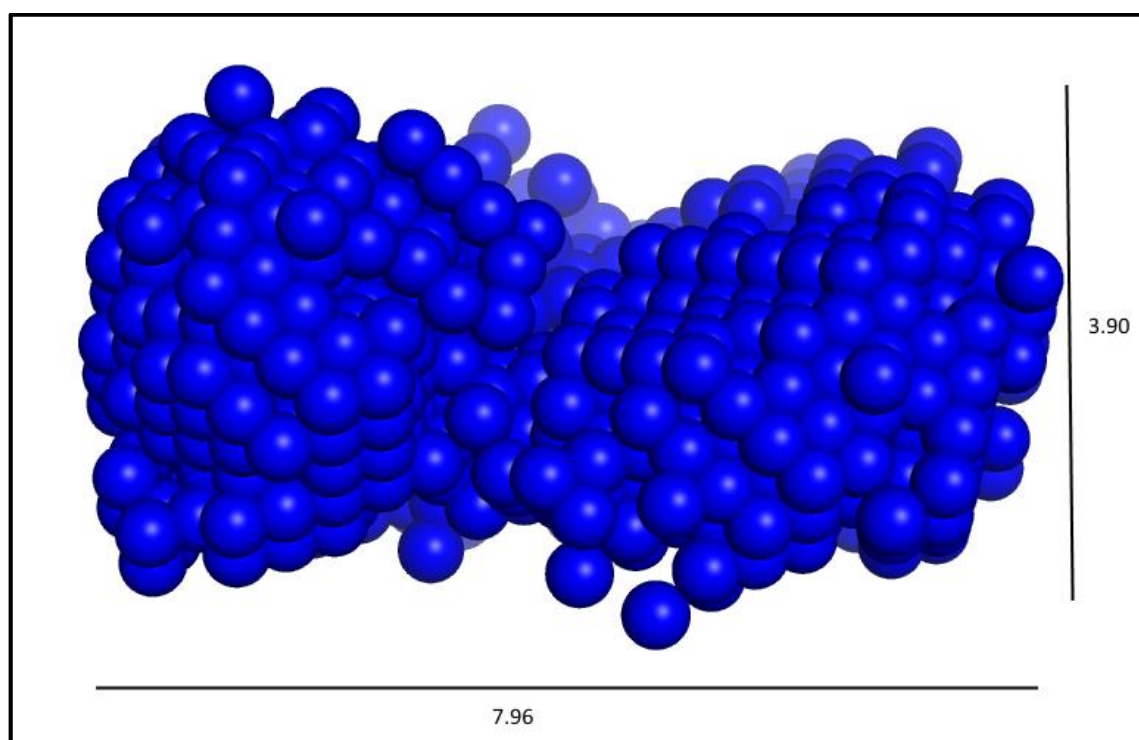


FIGURA 31: ENVELOPE MOLECULAR DE SAXS.

4.11 Análise do conteúdo de estrutura secundária de TcKAP7 recombinante

Através da análise do espectro de dicroísmo circular pode-se verificar o conteúdo de estrutura secundária da proteína e inferir enovelamento da proteína recombinante. Os dados obtidos para a TcKAP7 revelaram a presença de estruturas α , caracterizadas pelos mínimos pronunciados em 208 nm e 222 nm e de estruturas *coiled* na amostra de TcKAP7 caracterizada pelos mínimos pronunciados em 205 nm (FIGURA 32). Este resultado está de acordo a predição de estrutura secundária

realizada pelo servidor PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>), (FIGURA 33). Esses resultados sugerem que a proteína recombinante possui correto enovelamento.

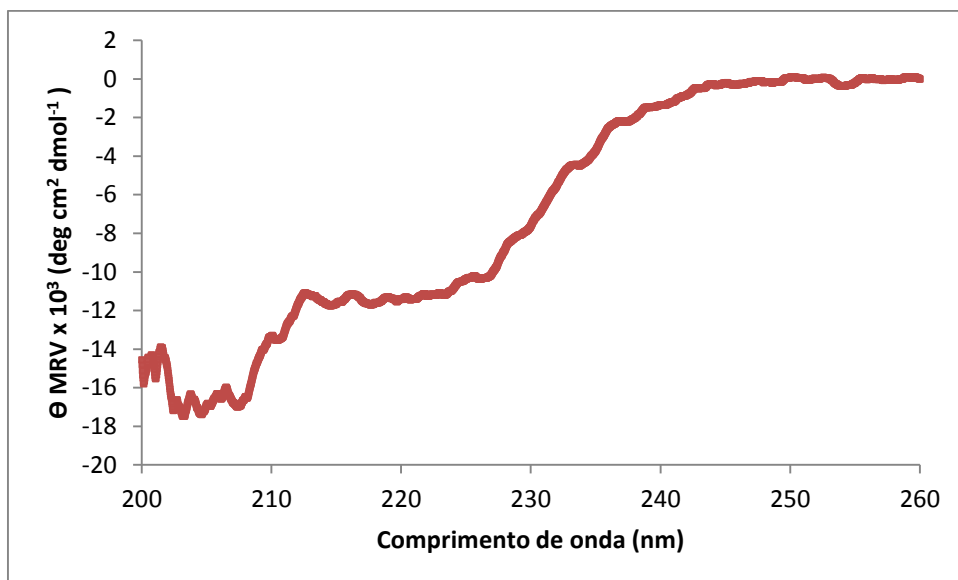


FIGURA 32: ESPECTRO DE DICROÍSMO CIRCULAR DE TcKAP7.

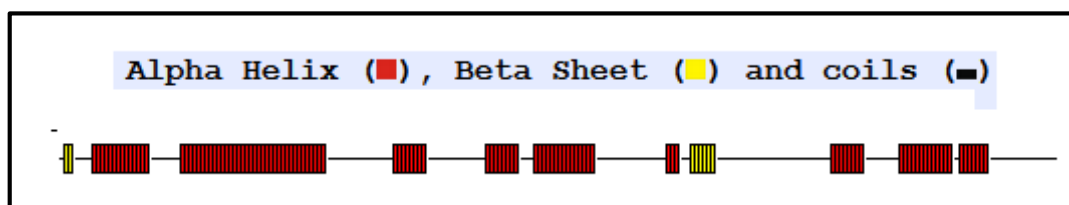


FIGURA 33: PREDIÇÃO DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA DE TcKAP7.

4.12 Análise estrutural de TcKAP7

A fim de obter-se a estrutura tridimensional de TcKAP7 por cristalografia de raios-X foram realizados ensaios de cristalização. Foi possível observar a formação de um cristal em apenas uma condição: Imidazol 0,1 M, Polietilenoglicol (PEG) 8,000 10% w/v e Acetato de cálcio 0,2 M.

A visualização através de luz ultra-violeta, através do equipamento Rock Imager, Fomulatrix, permitiu identificá-lo como cristal de proteína, já que este diferencia-se de cristal de sal pela fluorescência quando excitado em comprimento de onda de 280 nm.

O perfil do cristal pode ser visualizado na figura 34. Esse cristal encontra-se pequeno e mal-formado. Além disso, os métodos para a determinação estrutural de uma estrutura inédita (sem homologia com estruturas conhecidas) necessitam de mais de um cristal. Dessa forma, foram realizados refinamentos dessas condições iniciais visando aumentar q quantidade de cristais, aumentar seu tamanho e melhorar sua organização. A concentração de PEG (5 A 10%) e do pH (6 a 9) com intervalos de 1 unidade, foram alterada. Entretanto, mesmo assim não foi possível a obtenção de cristais adequados para a difração de raios X e novos refinamentos serão necessários.

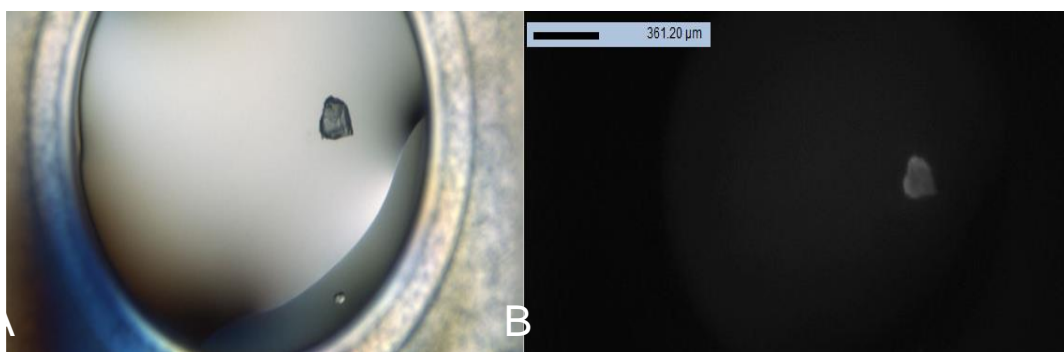


FIGURA 34: CRISTAL DE TcKAP7 DE T. CRUZI.

LEGENDA: A.Obtenção do cristal de TcKAP7 na condição de :Imidazol 0,1 M, Polietilenoglicol (PEG) 8,000 10% w/v e Acetato de cálcio 0,2 M e B. Cristal de TcKAP7 visto sob luz ultravioleta.

Uma vez que não foi possível, durante o desenvolvimento desse projeto, a obtenção da estrutura cristalográfica de TcKAP7, procedeu-se com a construção de seu modelo molecular.

A modelagem molecular é uma ferramenta que permite a obtenção de modelos da estrutura tridimensional de uma determinada proteína com base em homologia sequencial ou estrutural com proteínas cujas estruturas tridimensional foram experimentalmente resolvidas.

Para a construção do modelo foi utilizado o programa MODELLER (SALI & BLUNDELL, 1993), este programa é utilizado para a modelagem por homologia a estruturas tridimensionais de proteínas. O programa automaticamente constrói um modelo baseado na análise de um alinhamento de sequências entre a proteína para a qual se deseja construir o modelo e uma proteína relacionada cuja estrutura tridimensional já foi resolvida. Nesse caso foram utilizadas estruturas de duas

proteínas como molde para a construção da estrutura de TcKAP7. A estrutura da proteína HMGB1(código de acesso no banco de dados de proteínas: 2GZK) (www.pdb.org) para a porção amino-terminal e a estrutura do fator A de transcrição mitocondrial (código de acesso: 3TQ6) para a porção carboxi-terminal da proteína (FIGURA 35A). Duas proteínas foram selecionadas para a construção do modelo de TcKAP7 visto que a similaridade de sequência entre TcKAP7 e proteínas com estruturas resolvidas é bastante baixo. A similaridade sequencial de TcKAP7 e proteína HMGB1 é de 22,4% e entre TcKAP7 e o fator A de transcrição mitocondrial é de 26,4%. No entanto, ambas proteínas possuem alta similaridade em relação à estrutura secundária (mais de 90%). Para aumentar a confiabilidade do modelo, utilizamos uma proteína para construir a sequência N-terminal de TcKAP7 (aminoácidos 1-184) e outra para o C-terminal (aminoácidos 185-248).

A qualidade do modelo pode ser avaliada, por exemplo, através de gráficos e tabelas que analisam restrições químicas e físicas de cada átomo constituinte do modelo. Neste trabalho foi utilizado o gráfico de Ramachandran (FIGURA 35B), nele pode-se visualizar todas as combinações possíveis de ângulos diédricos Ψ (psi) versus os Φ (phi) nos aminoácidos de um polipeptídeo, e que contribuem para a conformação das estruturas das proteínas (RAMACHANDRAN *et al.*, 1963). Dos 230 resíduos, apenas 5 estão em regiões não permitidas do gráfico. Esse é um excelente valor, pois é similar ao valor médio encontrado para estruturas experimentalmente determinadas com resolução de no mínimo 2.0 Å (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/profunc>).

Também é possível visualizar a topologia de TcKAP7 (FIGURA 35 C), que mostra as regiões de α -hélices e regiões de *coiled* presentes na proteína, corroborando com os dados obtidos na espectroscopia de dicroísmo circular.

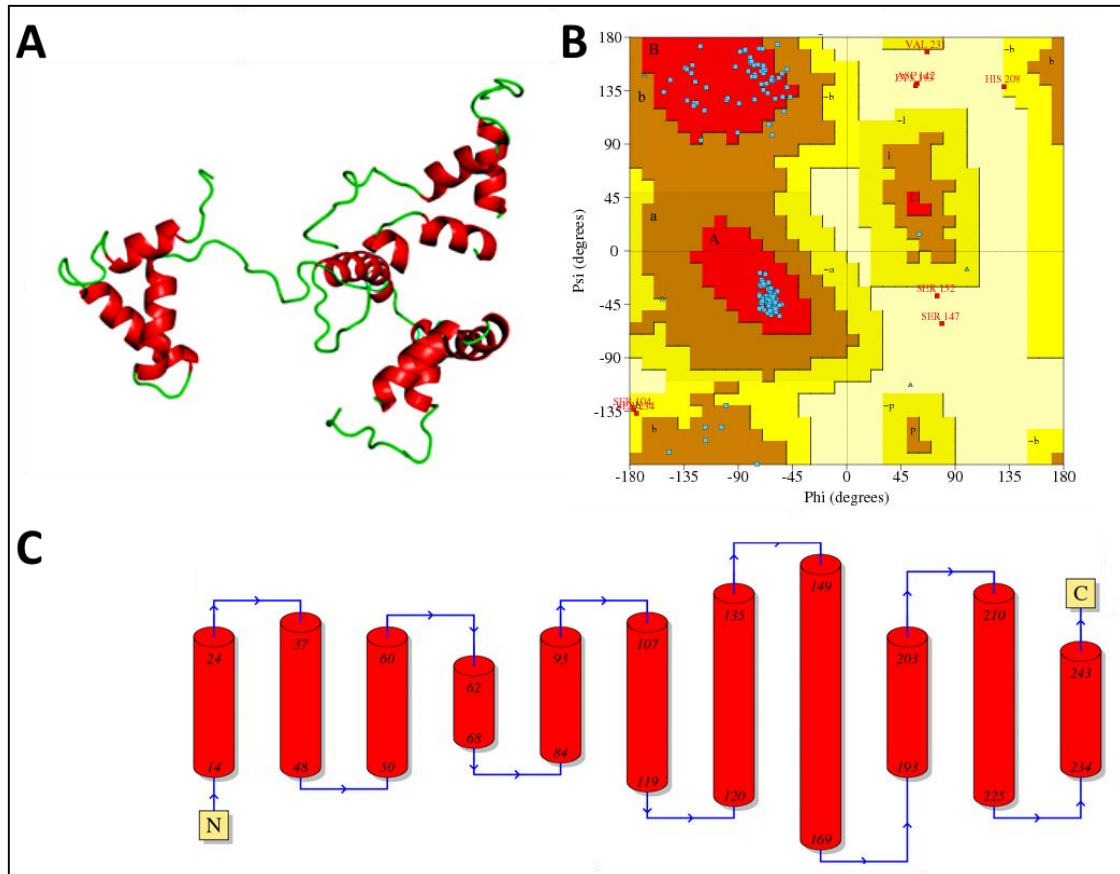


FIGURA 35: ESTRUTURA DE TcKAP7.

LEGENDA: A. Modelo tridimensional de KAP7; B. Gráfico de Ramachandran e C. Topologia de TcKAP7.

A análise da superfície eletrostática de TcKAP7 mostra que existem regiões ricas em aminoácidos com cargas positivas que podem conferir afinidades à outras proteínas com carga superficial negativa ou mesmo ácidos nucleicos (FIGURA 36).

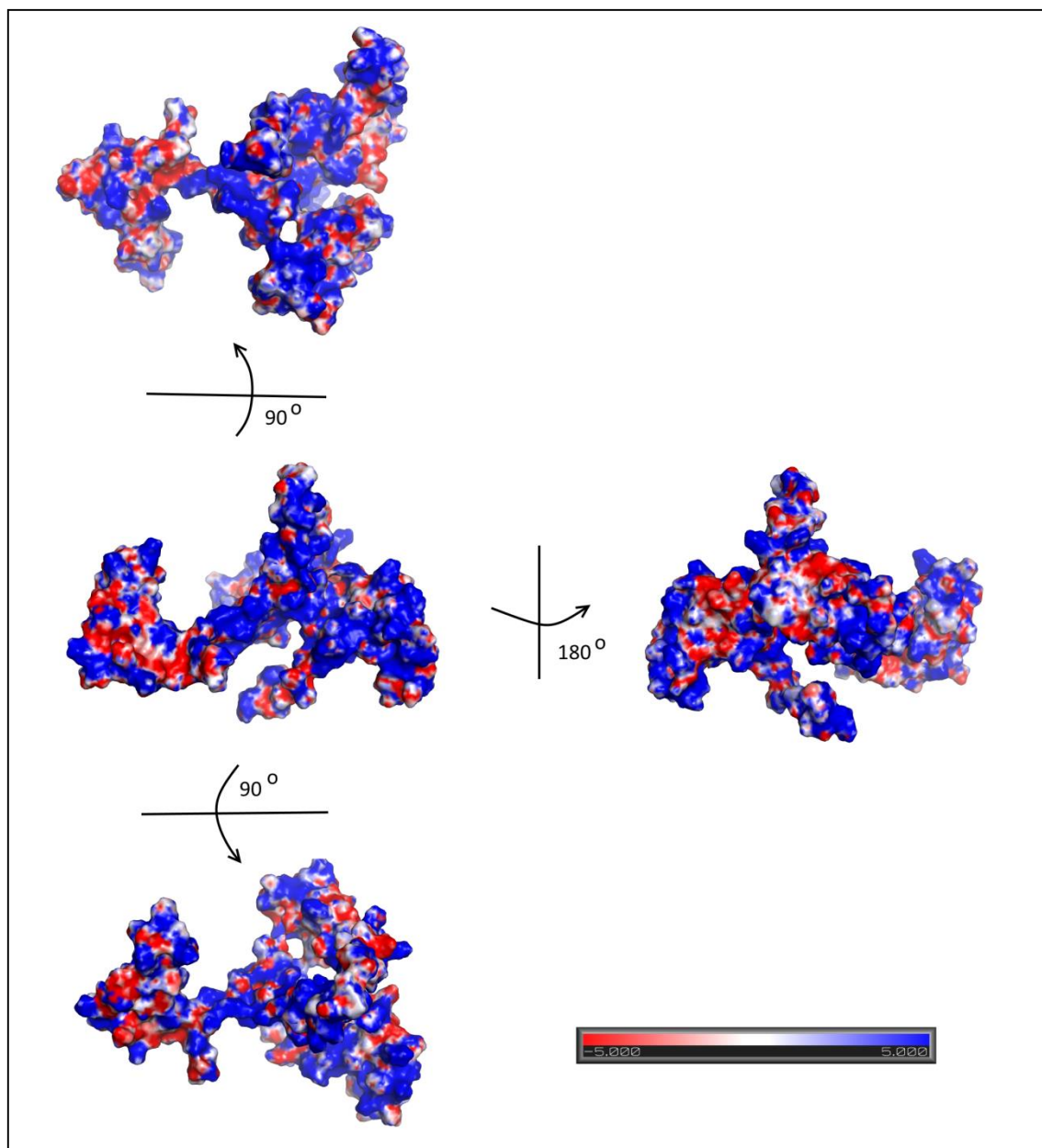


FIGURA 36: SUPERFÍCIE ELETROSTÁTICA DE TcKAP7.

LEGENDA: Visualização de diferentes regiões de TcKAP7. Vermelho: potencial negativo, Azul: potencial positiva, Branco: Neutro.

4.13 Investigação de possíveis funcionalidades baseadas na estrutura de TcKAP7

4.13.1 Predição de função para TcKAP7

A predição de função para TcKAP7 foi realizada a partir do enovelamento de proteínas utilizando o servidor Profunc (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/profunc/>). O objetivo do servidor ProFunc é ajudar na identificação de uma possível função bioquímica de uma proteína a partir da sua estrutura tridimensional. Ele utiliza uma série de métodos, incluindo comparação de enovelamento, conservação dos resíduos e modelos 3D funcionais, tanto para identificar prováveis sítios ativos da proteína quanto possíveis homólogos no Protein Data Bank (PDB). Neste procedimento tenta-se ajustar a estrutura da proteína de interesse aos tipos de enovelamentos de proteínas conhecidas. Atualmente mais de 1000 tipos já foram registrados e depositados em bibliotecas de enovelamentos.

Sabe-se que o alinhamento estrutural entre proteínas consideradas de uma mesma família, mesmo que seja apenas na região do sítio ativo, pode ser um importante método para se inferir a função da sequência em estudo (LASKOWSKI *et al.*, 2003). A evolução tende a conservar funções que dependem mais diretamente das estruturas 3D que das similaridades entre as sequências de aminoácidos das proteínas (SANCHEZ *et al.*, 2000).

Neste trabalho, as quatro estruturas que possuem maior similaridade estrutural com TcKAP7 estão depositadas no Protein Data Bank (PDB) com os códigos: 3TQ6, 4NOD, 3TMM, 4NNU. Todas as estruturas são referentes à proteína TFAM (fator transcricional A mitocondrial).

As estruturas proteicas foram obtidas no banco de dados públicos de proteínas PDB (*Protein Data Bank*) e submetidas a um alinhamento estrutural com o modelo de TcKAP7 (FIGURA 35A) no programa WinCoot. Esse alinhamento pode ser visualizado na figura 37. As regiões em vermelho representam as regiões de TcKAP7 que apresentam interação com DNA, pois se alinham com as regiões de ligação à DNA das outras proteínas e as regiões em azul representam regiões sem homologia com as demais.

Esse resultado sugere que TcKAP7 pode interagir com DNA, com isso estes dados podem ser utilizados para nortear mais estudos sobre a interação das proteínas KAP's com o DNA do cinetoplasto de *T. cruzi*.

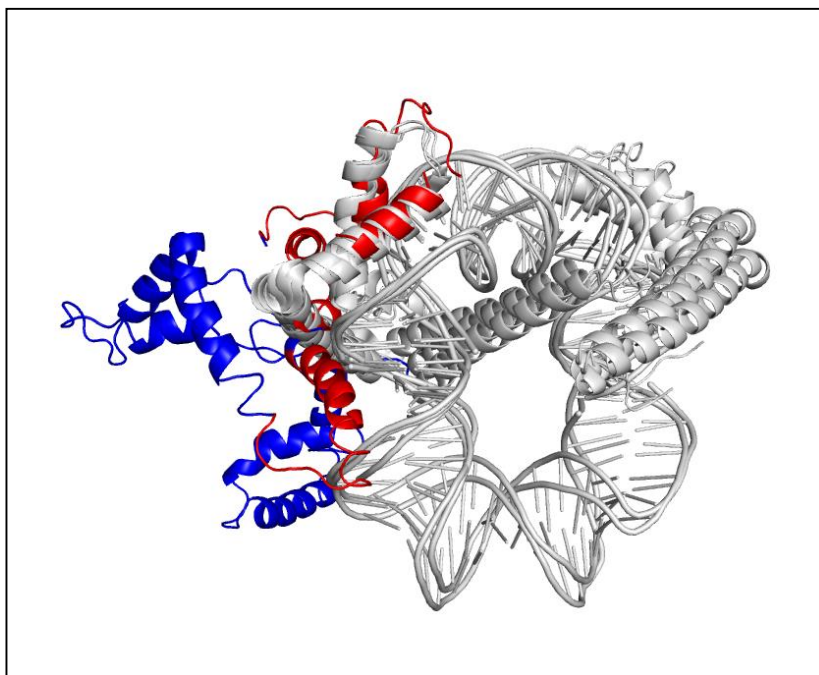


FIGURA 37: ALINHAMENTO ESTRUTURAL DE 3TQ6, 4NOD, 3TTM, 4NNU E TcKAP7.

LEGENDA: Em vermelho encontram-se as regiões de TcKAP7 que podem interagir com DNA (Resíduos 1-67 e 140-166) e em azul regiões sem homologia com as demais.

4.13.2 Análises preliminares da possível interação entre TcKAP7 e kDNA

As predições estruturais sugeriram que a proteína TcKAP7 possui motivos similares à proteínas que interagem com DNA. No entanto, a sequência de aminoácidos entre as proteínas é bastante baixa. Como a função de TcKAP7 permanece obscura, foram realizados alguns ensaios para tentar verificar a possibilidade desta proteína interagir com kDNA. Para isto, utilizou-se a técnica de dicroísmo circular para avaliar se a presença de kDNA poderia resultar em alterações estruturais em TcKAP7, o que seria uma evidência da possível interação entre esta proteína e o ácido nucleico.

Foram realizadas medidas de dicroísmo circular com amostras de TcKAP7, kDNA e TcKAP7 na presença de kDNA. Para a análise de dados foi realizado o somatório das curvas obtidas com as amostras de TcKAP7 e kDNA separadamente. Este somatório resultou em uma curva teórica que indica o perfil teórico de uma amostra contendo TcKAP7 e kDNA sem interações presentes. À essa curva foi sobreposta a curva experimental da medida de dicroísmo circular de TcKAP7 na

presença de kDNA. A figura 38 ilustra essa sobreposição, onde pode-se verificar que as curvas não se sobrepõem, portanto, alterações estruturais ocorrem em TcKAP7 na presença de kDNA.

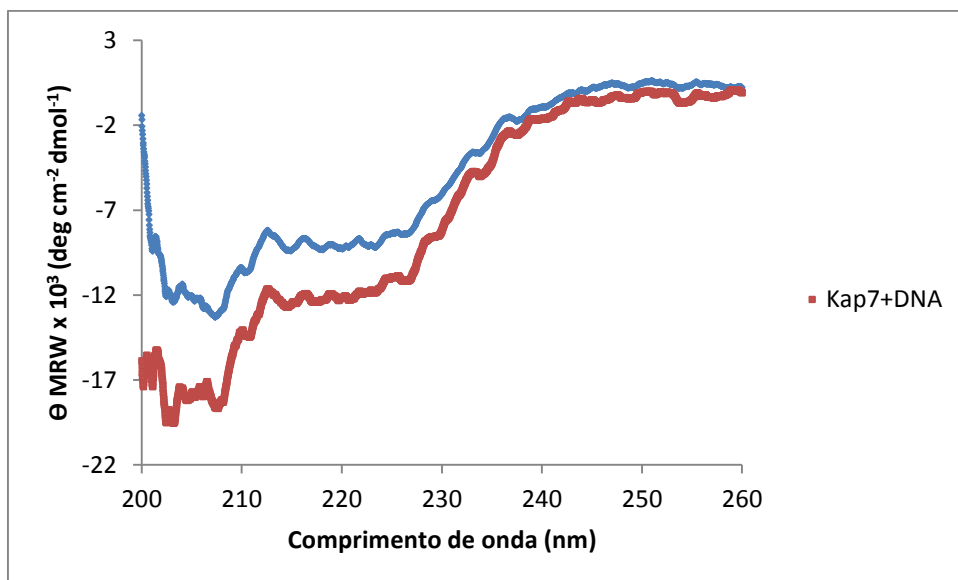


FIGURA 38: ESPECTRO DE DICROÍSMO CIRCULAR DE TcKAP7.

LEGENDA: Em azul encontra-se o espectro experimental de TcKap7 na presença de DNA; em vermelho o espectro teórico de TcKAP7 e DNA.

Para investigar mudanças estruturais associadas a interação com kDNA, foi realizada uma coleta de dados de SAXS na presença de 1 µg de kDNA.

A comparação dos modelos de baixa resolução por SAXS indica uma diferença conformacional pontual da proteína na presença de kDNA. As figuras 28 e 29 mostram os envelopes da proteína TcKAP7 na ausência (FIGURAS 39A e 40A) e presença de kDNA de *T. cruzi* (FIGURA 39B e FIGURA 40B). Percebe-se uma diferença de densidade eletrônica na região da hélice (Resíduos 140 - 166 evidenciados em vermelho). No envelope de TcKAP7 ela é bastante flexível e não é observada densidade eletrônica nessa região, no entanto, na presença de kDNA essa mesma região mostra-se mais rígida e é possível estimar seu posicionamento baseado na densidade eletrônica. Além disso, essa hélice é predita como interatora de DNA com base nas análises estruturais previamente realizadas nesse trabalho.

Esses dados sugerem uma mudança conformacional da proteína na presença do kDNA, fazendo com que esta mude seu arranjo estrutural para permanecer ligada à molécula de DNA, sugerindo uma interação entre TcKAP7 e DNA do cinetoplasto

de *T. cruzi*. Esses dados corroboram com o que foi visto na superfície eletrostática (FIGURA 36) e no alinhamento estrutural (FIGURA 37).

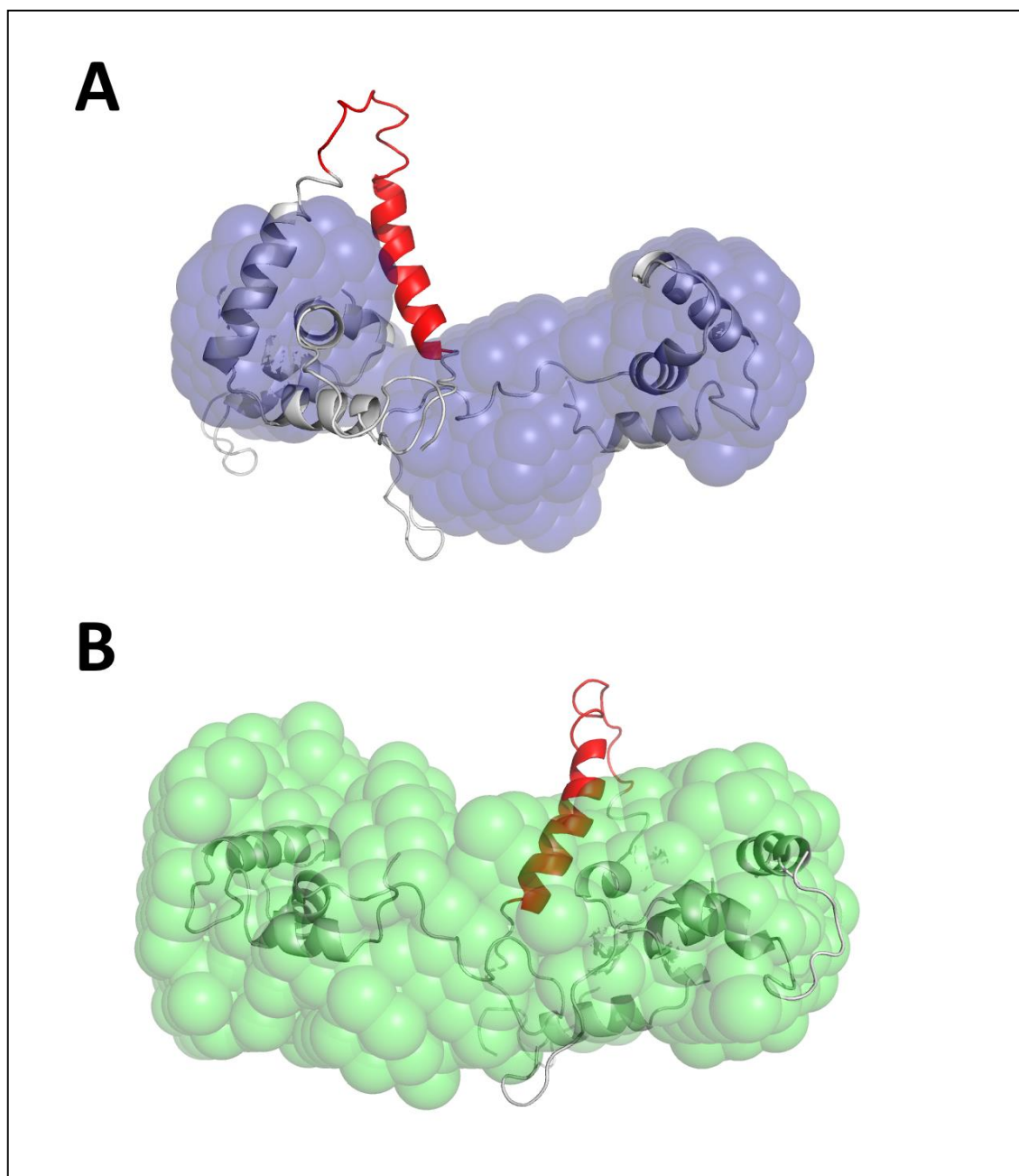


FIGURA 39: ENVELOPE MOLECULAR DETcKAP7.

LEGENDA: A. Monômero de TcKAP7 ajustado ao envelope de SAXS. B. Monômero de TcKAP7 + kDNA ajustado ao envelope de SAXS. Resíduos 140- 166 evidenciados em vermelho.

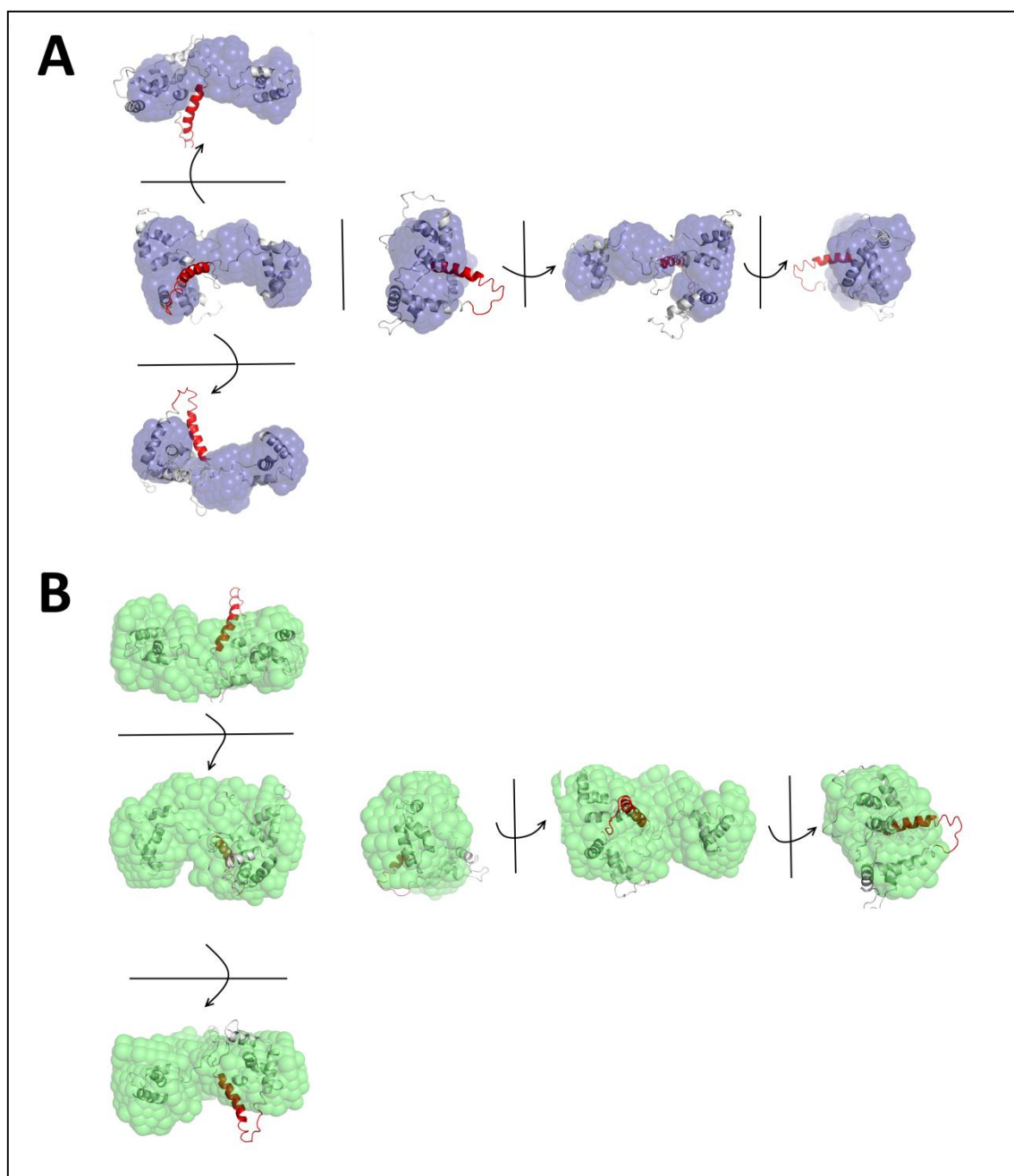


FIGURA 40: ENVELOPE MOLECULAR DE TcKAP7 VISTO EM DIFERENTES ÂNGULOS.

LEGENDA: A. Monômero de TcKAP7 ajustado ao envelope de SAXS. B. Monômero de TcKAP7 + kDNA ajustado ao envelope de SAXS. Resíduos 140- 166 evidenciados em vermelho.

5. DISCUSSÃO

O *Trypanosoma cruzi*, pertence a um grupo que divergiu muito cedo na linhagem eucariótica, apresentando diversas características únicas em relação a outros eucariotos. Uma dessas características é a presença de uma mitocôndria única ramificada pelo corpo do protozoário, contendo uma região especializada, o cinetoplasto, onde reside o DNA mitocondrial, também conhecido como kDNA. O kDNA é composto por uma rede de moléculas interligadas entre si, os maxicírculos e os minicírculos (SHAPIRO & ENGLUND, 1995). Mais de 30 proteínas envolvidas na replicação e na manutenção do kDNA já foram identificadas e acredita-se que um número aproximado de 100 proteínas, muitas delas presentes apenas em cinetoplastídeos, possam estar envolvidas nesses processos (LIU *et al.*, 2005). A maioria dessas proteínas foi identificada em *T. brucei* e *C. fasciculata* e, possivelmente várias delas, principalmente aquelas envolvidas em replicação, devem estar codificadas no genoma do *T. cruzi*.

Apesar de serem conhecidos muitos dos componentes da maquinaria de replicação dos minicírculos e maxicírculos, não se pode dizer o mesmo para as proteínas envolvidas na manutenção da estrutura do kDNA. Com exceção de 4 proteínas com características de histonas H1 (KAP1 a 4) encontradas associadas ao cinetoplasto de *C. fasciculata*, pouco ainda é conhecido sobre as proteínas que participam da organização do kDNA em outros tripanosomatídeos.

Zavala-Castro e colaboradores (2002) identificaram sete proteínas, variando de 19 a 31 kDa, associadas ao kDNA de formas epimastigotas de *T. cruzi*, a partir de kDNA extraído de células fixadas com formaldeído. Os tamanhos observados são compatíveis com aqueles das KAPs encontradas por Xu e Ray (1993), usando experimento similar em *C. fasciculata*, entretanto, nenhuma das possíveis KAPs descritas por Zavala-Castro e colaboradores foi caracterizada.

Nós iniciamos estudos objetivando identificar proteínas envolvidas na organização e segregação do kDNA de *T. cruzi*, a partir dos dados fornecidos pelo sequenciamento do genoma desse parasita, fazendo uma comparação com as KAPs de *C. fasciculata*. Estudos realizados por Cavalcanti e colaboradores (2009), usando como modelo as sequências de KAPs de *C. fasciculata*, identificaram 35 proteínas relacionadas em diferentes tripanosomatídeos, cujos genomas estão sequenciados (11 em *T. cruzi*; 7 em *L. braziliensis*; 6 em *L. major* e *L. infantum*; e 5

em *T. brucei*). Essas sequências puderam ser agrupadas em 7 tipos diferentes de KAPs (KAP1 a 7). Das 7 KAPs, *T. cruzi* possui 5 (TcKAP3 a 7), cuja a sintenia gênica é uma das características marcantes, já que alguns genes divergem em relação ao tamanho e portanto no tamanho da proteína codificada. As KAPs de *T. cruzi* e *T. brucei* são maiores do que as de *C. fasciculata* e *Leishmania spp.* Isso pode sugerir que KAPs possam ter evoluído para um tamanho que comporte basicamente suas funções de associação com o kDNA de maneira mais eficiente.

Os resultados obtidos por Cavalcanti *et al.*, (2009) para TcKAP4 e TcKAP6 mostraram que em epimastigotas e amastigotas, estas duas proteínas estão distribuídas ao longo de toda a rede de kDNA, consistente com o que foi observado em *C. fasciculata*, (XU *et al.*, 1996; HINES & RAY, 1998), porém CfKAP4 também apresentou um padrão de marcação nos pólos opostos do kDNA, sugerindo que essa KAP em particular se associe aos minicírculos recém-replicados antes de sua reintegração à rede de kDNA (XU *et al.*, 1996). Contudo, em tripomastigotas de *T. cruzi*, estas duas proteínas estão distribuídas na periferia da rede de kDNA (CAVALCANTI *et al.*, 2009), indicando que diferente de *C. fasciculata*, elas apresentam uma dinâmica de associação que depende da forma evolutiva do parasita, possivelmente, refletindo distintas interações com proteínas da rede de kDNA em epimastigotas e tripomastigotas. No presente trabalho, ampliamos o conhecimento sobre as KAPs de *T. cruzi*, estudando o papel da KAP7 na fisiologia desse parasita.

Em *C. fasciculata* a regulação da expressão de vários genes que codificam proteínas mitocondriais ocorre durante o ciclo celular, em parte por uma sequência consenso [(C/A)AUAGAA(G/A)] presente nas regiões 5' e 3'-UTR dos respectivos mRNAs (BROWN & RAY, 1997; MAHMOOD *et al.*, 1999; MAHMOOD & RAY, 1998; PASION *et al.*, 1996). O mesmo foi observado para *L. major*, onde uma sequência parecida com aquela encontrada em *C. fasciculata* (CATAGA), foi identificada nas regiões 5' e 3' de vários genes, cuja a expressão era maior na fase S do ciclo celular (ZICK *et al.*, 2005). Analisando as regiões 5' e 3' do transcrito do gene TOP2 de *T. cruzi*, que codifica a topo II mitocondrial, descrito por Fragoso e Goldenberg (1992), também podemos observar a sequência CATAGA repetida duas vezes na região 5'UTR e uma vez na região 3'-UTR do transcrito desse gene.

Como relatamos neste trabalho, a sequência da região 5'-UTR do transcrito *TcKAP7* não mostrou nenhum elemento com as características daquele envolvido na

regulação de genes expressos na fase S do ciclo celular de outros tripanosomatídeos.

Em relação à localização de TcKAP7 verificamos, através de ensaios de imunofluorescência, a distribuição de TcKAP7 na região dos pólos da rede de kDNA das formas epimastigotas de *T. cruzi*, porém ainda não analisamos como esta proteína está distribuída nas formas tripomastigotas, que possuem a rede de kDNA com formato arredondado e menos compactada.

A localização de KAP7 na região dos pólos do cinetoplasto de *T. cruzi*, sugere que ela tenha funções na replicação da rede de kDNA, pois nessa região estão concentradas diversas proteínas necessárias para finalização do processo de replicação de minicírculos.

Para a construção do modelo molecular de TcKAP7 foram utilizadas estruturas de duas proteínas: a estrutura da proteína HMGB1 (2GZK) para a porção amino-terminal e a estrutura da proteína fator A de transcrição mitocondrial (3TQ6) para a porção carboxi-terminal da proteína, ambas apresentam alta similaridade em relação à estrutura secundária (mais de 90%) e tratam-se de proteínas de um mesmo grupo, HMG (High-mobility group). Em *T. brucei*, TbKAP6, uma proteína do grupo HMG, está envolvida na replicação e manutenção do kDNA (WANG *et al.*, 2014). Baseado nesses dados juntamente com os dados da imunofluorescência indireta, pode-se sugerir um papel de TcKAP7 na replicação da rede de kDNA.

Embora ainda não saibamos como KAP7 se associa com o kDNA de *T. cruzi*, é possível que isso ocorra de duas maneiras: através de ligações eletrostáticas não-específicas ou de interações com regiões específicas dos minicírculos.

Através de ensaios de SAXS foi possível perceber que a proteína sofre alterações conformacionais na presença do kDNA, sugerindo sua interação com esse ácido nucléico. Esta interação pode ser eletrostática, uma vez que a análise da superfície eletrostática de TcKAP7 mostrou a predominância de regiões ricas em aminoácidos com cargas positivas que podem conferir afinidades à outras proteínas com carga superficial negativa ou mesmo ácidos nucleicos, mais uma vez sugerindo a interação com kDNA.

Porém, não se pode descartar a possibilidade de que a interação de TcKAP7 com o kDNA seja através de interações com regiões específicas dos minicírculos. Nos tripanosomatídeos a rede de kDNA assume a forma de um disco achatado,

perpendicular ao flagelo, onde os minicírculos estão alinhados em fibrilas, orientadas paralelamente ao eixo do disco (LIU *et al.*, 2005). Acredita-se que a ordenação e compactação dos minicírculos estão relacionadas à própria estrutura da molécula de minicírculo. Os minicírculos apresentam regiões ricas em A+T que podem causar curvaturas na molécula (MARINI *et al.*, 1984; NTAMBI *et al.*, 1984), facilitando sua inserção de forma ordenada no disco de kDNA, além disso possuem regiões conservadas onde estão localizadas as origens de replicação. Essas regiões, por sua vez podem ser reconhecidas por proteínas, tais como a KAP7 que ajudam a estabilizar a estrutura. Os resultados com *C. fasciculata* mostram que KAP2, 3 e 4 se ligam em regiões específicas dos minicírculos, ricas em A+T, mas que não são aquelas que geram a curvatura das moléculas (XU *et al.*, 1996). Contudo, KAP1 se liga de maneira inespecífica aos minicírculos (HINES & RAY, 1998). Além disso, existe a sequência universal de minicírculo (UMS) e as proteínas que se ligam a essa sequência (UMSBP), as quais podem participar de interações com as KAP's. Em *C. fasciculata*, *CfKAP3* sozinha consegue condensar a rede de kDNA e inibir a decatenação pela enzima topo II. Porém, a interação entre *CfKAP3* e *CfUMSBP* pode descondensar a rede de kDNA e reestabelecer a decatenação mediada pela topo II, indicando que as proteínas KAP's dos tripanosomatídeos podem apresentar diferentes funções em diferentes espécies (KAPELLER *et al.*, 2011).

Para investigar a importância de *TcKAP7* no *T. cruzi* e seu envolvimento, ou não, com o rearranjo topológico do kDNA durante o processo de diferenciação do parasita, realizamos a deleção do gene *TcKAP7*. Nenhuma alteração estrutural ou morfológica na rede de kDNA foi observada no mutante de *T. cruzi* para *TcKAP7*. Do mesmo modo, o parasita mutante não apresentou perfil de crescimento alterado, e foi capaz de se diferenciar nas formas tripomastigotas metacíclicas e infectar células VERO, onde se diferenciaram em formas amastigotas. O mesmo foi visto quando foi realizado o nocaute do gene *TcKAP3* (DE SOUZA *et al.*, 2010).

Uma das hipóteses para explicar esse fato é que alguma outra KAP de *T. cruzi* possa estar assumindo o papel da *TcKAP7*, talvez a *TcKAP4* que se localiza nos pólos do cinetoplasto, quando da inserção dos minicírculos na rede após serem replicados na região cinetoflagelar. A redundância no papel das KAPs faz com que a rede de kDNA seja compactada e segregada corretamente, mesmo na ausência de uma delas (DE SOUZA *et al.*, 2010). Sabe-se que o nocaute do gene *Cfkap2* ou do gene *Cfkap3* separadamente não mostrou nenhuma alteração no fenótipo de *C.*

fasciculata. Porém, a deleção de ambos os genes causou diversas alterações: aumento nos níveis de mRNAs mitocondriais, redução na respiração, inibição da divisão celular e acúmulo de células com morfologias anormais (AVLIYAKULOV et al., 2004).

Com o intuito de complementar os estudos para a caracterização do gene *TcKAP7*, foram realizados ensaios de RNA de interferência visando analisar a função do gene *TbKAP7*, ortólogo em *T. brucei*, já que a maquinaria de RNAi em *T. cruzi* é inexistente (DA ROCHA et al., 2003). Com isso foi visto que a participação da *TbKAP7* no metabolismo do *T. brucei* é essencial, já que o silenciamento do gene *TbKAP7* levou à redução da proliferação celular do parasita, corroborando com os dados encontrados para *TbKAP6* (WANG et al., 2014).

Esperamos que o conhecimento das diversas moléculas envolvidas na organização e replicação da rede de kDNA, assim como o entendimento dos mecanismos fisiológicos que ocorrem nesta estrutura tão peculiar que é o cinetoplasto dos tripanosomatídeos, possam nos ajudar a esclarecer vários aspectos relacionados a biologia destes eucariotos primitivos e a evolução do genoma mitocondrial ao longo do processo evolutivo.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados observados neste trabalho, foi possível concluir:

1 – A proteína TcKAP7 é uma proteína associada ao cinetoplasto, de *T. cruzi* e possui características que a identificam como KAPs do tipo histona H1, incluindo seu tamanho e sua composição de aminoácidos e sua superfície eletrostática;

2 – TcKAP7 está localizada nos pólos do cinetoplasto de *T. cruzi*, podendo estar envolvida na replicação dos minicírculos;

3 - TcKAP7 sofre mudanças conformacionais na presença do kDNA de *T. cruzi*, evidenciando sua interação com o ácido nucleico;

4 – O mutante de *T. cruzi* para *TcKAP7*, não apresentou alteração na estrutura do cinetoplasto e na morfologia do parasita;

5 – A proliferação e a diferenciação do *T. cruzi* não foram alteradas, quando o parasita teve o gene *TcKAP7* deletado do genoma;

6 – O silenciamento do gene *TbKAP7* é essencial no metabolismo do *T. brucei*, levando à redução da proliferação celular do parasita.

7. REFERÊNCIAS

AGABIAN, N. **Trans splicing of nuclear pre-mRNAs.** Cell 61: 1157-1160, 1990.

AVLIYAKULOV, N. K.; LUKES, J. & RAY, D. S. **Mitochondrial histone-like DNA-binding proteins are essential for normal cell growth and mitochondrial function in *Crithidia fasciculata*.** Eukaryot. Cell 3: 518-26, 2004.

BATISTA, M.; MARCHINI, F. K.; CELEDON, P. A.; FRAGOSO, S. P.; PROBST, C. M.; PRETI, H.; OZAKI, L. S.; BUCK, G. A.; GOLDENBERG, S.; KRIEGER, M. A. **A high-throughput cloning system for reverse genetics in *Trypanosoma cruzi*.** BMC Microbiol, v. 10, p. 259, 2010.

BELTRAO HDE, B.; P. CERRONI MDE, D. R. FREITAS, A. Y. PINTO, C. VALENTE VDA, S. A. VALENTE, G. COSTA EDE e J. SOBEL. **Investigation of two outbreaks of suspected oral transmission of acute Chagas disease in the Amazon region, Para State, Brazil, in 2007.** Trop Doct, v.39, n.4, Oct, p.231-2, 2009.

BENNE, R. **RNA editing in trypanosomes.** Eur. J. Biochem. 221(1): 9-23, 1994.

BERRIMAN, M.; GHEDIN, E.; HERTZ-FOWLER, C.; BLANDIN, G.; RENAULD, H.; BARTHOLOMEU, D. C.; LENNARD, N. J.; CALER, E.; HAMLIN, N. E.; HAAS, B.; BOHME, U.; HANNICK, L.; ASLETT, M. A.; SHALLOM, J.; MARCELLO, L.; HOU, L.; WICKSTEAD, B.; ALSMARK, U. C. M.; ARROWSMITH, C.; ATKIN, R. J.; BARRON, A. J.; BRINGAUD, F.; BROOKS, K.; CARRINGTON, M.; CHEREVACH, I.; CHILLINGWORTH, T. J.; CHURCHER, C.; CLARK, L. N.; CORTON, C. H.; CRONIN, A.; DAVIES, R. M.; DOGGETT, J.; DJIKENG, A.; FELDBLYUM, T.; FIELD, M. C.; FRASER, A.; GOODHEAD, I.; HANCE, Z.; HARPER, D.; HARRIS, B. R.; HAUSER, H.; HOSTETLER, J.; IVENS, A.; JAGELS, K.; JOHNSON, D.; JOHNSON, J.; JONES, K.; KERHORNOU, A. X.; KOO, H.; LARKE, N.; LANDFEAR, S.; LARKIN, C.; LEECH, V.; LINE, A.; LORD, A.; MACLEOD, A.; MOONEY, P. J.; MOULE, S.; MARTIN, D. M. A.; MORGAN, G. W.; MUNGALL, K.; NORBERTCZAK, H.; ORMOND, D.; PAI, G.; PEACOCK, C. S.; PETERSON, J.; QUAIL, M. A.; RABBINOWITSCH, E.; RAJANDREAM, M. A.; REITTER, C.; SALZBERG, S. L.; SANDERS, M.; SCHOBEL, S.; SHARP, S.; SIMMONDS, M.; SIMPSON, A. J.; TALLON, L.; TURNER, C. M. R.; TAIT, A.; TIVEY, A. R.; VAN AKEN, S.; WALKER, D.; WANLESS, D.; WANG, S.; WHITE, B.; WHITE, O.; WHITEHEAD, S.; WOODWARD, J.; WORTMAN, J.; ADAMS, M. D.; EMBLEY, T. M.; GULL, K.; ULLU, E.; BARRY, J. D.; FAIRLAMB, A. H.; OPPERDOES, F.; BARRELL, B. G.; DONELSON, J. E.; HALL, N.; FRASER, C. M.; MELVILLE, S.E.; EL-SAYED, N. M. **The Genome of the African Trypanosome *Trypanosoma brucei*.** Science 309 (5733): 416-422, 2005.

BIRKENMEYER, L. & RAY, D. S. **Replication of kinetoplast DNA in isolated kinetoplasts from *Crithidia fasciculata***. J. Biol. Chem. 261: 2362–2368, 1986.

BIRKENMEYER, L.; SUGISAKI, H.; RAY, D. S. **Structural characterization of site-specific discontinuities associated with replication origins of minicircle DNA from *Crithidia fasciculata***. J. Biol. Chem. 262: 2384–2392, 1987.

BONALDO, M. C.; SOUTO-PADRON, T.; DE SOUZA, W.; GOLDENBERG, S. **Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation**. J. Cell. Biol. 106: 1349-1358, 1988.

BOUCHER, N.; WU, Y.; DUMAS, C.; DUBÉ, M.; SERENO, D.; BRETON, M.; PAPADOPOULOU, B. **A common mechanism of stage-regulated gene expression in *Leishmania* mediated by a conserved 3'-untranslated region element**. J. Biol. Chem. 277(19): 511-520, 2002.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. ***Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas**. Ed Guanabara Koogan. 2ª edição. 2000.

BROWN, L. M. & RAY, D. S. **Cell cycle regulation of RPA1 transcript levels in the trypanosomatid *Crithidia fasciculata***. Nucleic Acids Res. 25: 3281–3289, 1997.

CAMARGO, E. P. **Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*: I. Origin of metacyclic trypomastigotes in liquid media**. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 6: 93-100, 1964.

CAMPBELL, D. A.; THOMAS, S.; STURN, N. **Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal?** Microbes Infect. 5: 1231-1240, 2003.

CAVALCANTI, D. P.; THIRY, M.; DE SOUZA, W. & MOTTA, M. C. **The kinetoplast ultrastructural organization of endosymbiont-bearing trypanosomatids as revealed by deep-etching, cytochemical and immunocytochemical analysis**. Histochem Cell Biol. 130(6):1177-85, 2008.

CAVALCANTI, D. P.; SHIMADA, M. K.; PROBST, C. M.; SOUTO-PADRON, T. C. B. S.; DE SOUZA, W.; GOLDENBERG, S.; FRAGOSO, S. P.; MOTTA, M. C. M. **Expression and subcellular localization of kinetoplast-associated proteins in the different developmental stages of *Trypanosoma cruzi***. BMC Microbiol. 9: 120, 2009.

CLAYTON, C. E. **Life without transcriptional control? From fly to man and back again.** EMBO J. 21: 1881-1888, 2002.

CONTRERAS, V. T.; SALLES, J. M.; THOMAS, N.; MOREL, C. M.; GOLDENBERG, S. **In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions.** Mol. Biochem. Parasitol. 16: 315-327, 1985.

CONTRERAS, V. T.; ARAUJO-JORGE, T. C.; BONALDO, M. C.; THOMAS, N.; BARBOSA, H. S.; MEIRELLES, M. N. L.; GOLDENBERG, S. **Biological aspects of the DM 28C clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz 83: 123-133, 1988.

COSGROVE, W. B. & SKEEN, M. J. **The cell cycle in *Crithidia fasciculata*. Temporal relationships between synthesis of deoxyribonucleic acid in the nucleus and in the kinetoplast.** J Protozool. May;17(2):172-7, 1970.

DA ROCHA, W.; OTSU, K.; TEIXEIRA, S. M. R.; DONELSON, J. E. **Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*.** Mol Biochem Parasitol. v. 133, n. 2, p. 175-186. 2003.

DE SOUZA, F. S.; RAMPAZZO, R. DE C.; MANHAES, L.; SOARES, M. J.; CAVALCANTI, D. P.; KRIEGER, M. A.; GOLDENBERG, S. & FRAGOSO, S. P. **Knockout of the gene encoding the kinetoplast-associated protein 3 (KAP3) in *Trypanosoma cruzi*: effect on kinetoplast organization, cell proliferation and differentiation.** Mol. Biochem. Parasitol. 172(2): 90-98, 2010.

DE SOUZA, W. & SOUTO-PADRON, W. **The paraxial structure of the flagellum of trypanosomatidae.** J. Parasitol. 66(2): 229-236, 1980.

DE SOUZA, W. **Cell biology of *Trypanosoma cruzi*.** Int. Rev. Cytol. 86: 197-283, 1984.

DE SOUZA, W. **O parasito e sua interação com os hospedeiros. In: *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas.** Guanabara Koogan, Rio de Janeiro: 75-86, 1999.

DE SOUZA, W. **Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*.** Current Pharmaceutical Design 8: 269-285, 2002.

DE SOUZA, W.; SANT'ANNA, C.; CUNHA-E-SILVA, N. L. **Electron microscopy and cytochemistry analysis of the endocytic pathway of pathogenic protozoa.** Prog Histochem Cytochem, v. 44, n. 2, p. 67-124, 2009.

DE SOUZA, W. **Métodos morfológicos.** Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=12>>. Acesso em: 18/01/2015.

DIAS, E.; LARANJA, F. S.; MIRANDA, A. & NOBREGA, G. **Chagas' disease; a clinical, epidemiologic, and pathologic study.** Circulation. v.14, n 6 p.1035-60, 1956.

DIAS, J. C. P. **Epidemiologia. Em: Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas. Zigman Brener; Zilton Andrade; Manoel Barral-Neto** 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2000.

DOCAMPO, R.; DE SOUZA, W.; MIRANDA, K.; ROHLOFF, P.; MORENO, S. N. **Acidocalcisomes – conserved from bacteria to man.** Nat. Rev. Microbiol. 3: 251-261, 2005.

EL-SAYED, N. M.; MYLER, P. J.; BARTHOLOMEU, D. C.; NILSSON, D.; AGGARWAL, G.; TRAN, A. N.; GHEDIN, E.; WORTHEY, E. A.; DELCHER, A. L.; BLANDIN, G.; WESTENBERGER, S. J.; CALER, E.; CERQUEIRA, G. C.; BRANCHE, C.; HAAS, B.; ANUPAMA, A.; ARNER, E.; ASLUND, L.; ATTIPOE, P.; BONTEMPI, E.; BRINGAUD, F.; BURTON, P.; CADAG, E.; CAMPBELL, D. A.; CARRINGTON, M.; CRABTREE, J.; DARBAN, H.; DA SILVEIRA, J. F.; DE JONG, P.; EDWARDS, K.; ENGLUND, P. T.; FAZELINA, G.; FELDBLYUM, T.; FERELLA, M.; FRASCH, A. C.; GULL, K.; HORN, D.; HOU, L.; HUANG, Y.; KINDLUND, E.; KLINGBEIL, M.; KLUGE, S.; KOO, H.; LACERDA, D.; LEVIN, M. J.; LORENZI, H.; LOUIE, T.; MACHADO, C. R.; MCCULLOCH, R.; MCKENNA, A.; MIZUNO, Y.; MOTTRAM, J. C.; NELSON, S.; OCHAYA, S.; OSOEGAWA, K.; PAI, G.; PARSONS, M.; PENTONY, M.; PETTERSSON, U.; POP, M.; RAMIREZ, J. L.; RINTA, J.; ROBERTSON, L.; SALZBERG, S. L.; SANCHEZ, D. O.; SEYLER, A.; SHARMA, R.; SHETTY, J.; SIMPSON, A. J.; SISK, E.; TAMMI, M. T.; TARLETON, R.; TEIXEIRA, S.; VAN AKEN, S.; VOGT, C.; WARD, P. N.; WICKSTEAD, B.; WORTMAN, J.; WHITE, O.; FRASER, C. M.; STUART, K. D.; ANDERSSON, B. **The genome sequence of Trypanosoma cruzi, etiologic agent of Chagas disease.** Science 309(5733): 409-415, 2005.

ESTÉVEZ, A. M. & SIMPSON L. **Uridine insertion/deletion RNA editing in trypanosome mitochondria--a review.** Gene. 240(2): 247-60, 1999.

FIELD, M. C. & CARRINGTON, M. **The trypanosome flagellar pocket.** Nature Reviews Microbiology, 7, 775–786, 2009.

FOLDYNOVA-TRANTIRKOVA, S.; PARIS, Z.; STURM, N. R.; CAMPBELL, D. A.; LUKES, J. **The *Trypanosoma brucei* La protein is a candidate poly(U) shield that impacts spliced leader RNA maturation and tRNA intron removal.** Int J Parasitol. 35(4): 359-66, 2005.

FRAGOSO, S. P. & GOLDENBERG, S. **Cloning and characterization of the gene encoding *Trypanosoma cruzi* DNA topoisomerase II.** Mol. Biochem. Parasitol. 55: 127-34, 1992.

GILLINGER, G. & BELLOFATTO, V. **Trypanosome spliced leader RNA genes contains the first identified RNA polymerase II promoter in these organisms.** Nucleic Acids Res. 29: 1556-1564, 2001.

GLUENZ, E.; SHAW, M. K.; GULL, K. **Structural asymmetry and discrete nucleic acid subdomains in the *Trypanosoma brucei* kinetoplast.** Mol. Microbiol. 64(6): 1529-1539, 2007.

GOLDENBERG, S.; CONTRERAS, V. T.; SALLES, J. M.; BONALDO, M. C.; LIMA FRANCO, M. P. A.; LINSS, J.; LAFAILLE, J.; VALLE, D.; MOREL, C. M. **Facts and hypothesis on *Trypanosoma cruzi* differentiation.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz 79: 39-44, 1985.

GULL, K. **The cytoskeleton of trypanosomatid.** Annu. Rev. Microbiol. 53: 629-655, 1999.

HANNAERT, V.; BRINGAUD, F.; OPPERDOES, F. R.; MICHELS, P. A. **Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida.** Kinetoplastid Biol. Dis. 2(1): 11, 2003.

HINES, J. C. & RAY, D. S. **The *Crithidia fasciculata* KAP1 gene encodes a highly basic protein associated with kinetoplast DNA.** Mol. Biochem. Parasitol. 94: 41-52, 1998.

HINES, J. C. & RAY, D. S. **Structure of discontinuities in kinetoplast DNA-associated minicircles during S phase in *Crithidia fasciculata*.** Nucleic Acids Res. 36(2): 444–450, 2008.

HOARE, C. A. **[Rationalization of the terminology for the developmental stages of trypanosomatid flagellates]**. Med Parazitol (Mosk), v.40, n.3, May-Jun, p.307-9, 1971.

IVENS, A. C.; PEACOCK, C. S.; WORTHEY, E. A.; MURPHY, L.; AGGARWAL, G.; BERRIMAN, M.; SISK, E.; RAJANDREAM, M. A.; ADLEM, E.; AERT, R.; ANUPAMA, A.; APOSTOLOU, Z.; ATTIPOE, P.; BASON, N.; BAUSER, C.; BECK, A.; BEVERLEY, S. M.; BIANCHETTIN, G.; BORZYM, K.; BOTHE, G.; BRUSCHI, C. V.; COLLINS, M.; CADAG, E.; CIARLONI, L.; CLAYTON, C.; COULSON, R. M.; CRONIN, A.; CRUZ, A. K.; DAVIES, R. M.; DE GAUDENZI, J.; DOBSON, D. E.; DUESTERHOEFT, A.; FAZELINA, G.; FOSKER, N.; FRASCH, A. C.; FRASER, A.; FUCHS, M.; GABEL, C.; GOBLE, A.; GOFFEAU, A.; HARRIS, D.; HERTZ-FOWLER, C.; HILBERT, H.; HORN, D.; HUANG, Y.; KLAGES, S.; KNIGHTS, A.; KUBE, M.; LARKE, N.; LITVIN, L.; LORD, A.; LOUIE, T.; MARRA, M.; MASUY, D.; MATTHEWS, K.; MICHAELI, S.; MOTTRAM, J. C.; MULLER-AUER, S.; MUNDEN, H.; NELSON, S.; NORBERTCZAK, H.; OLIVER, K.; O'NEIL, S.; PENTONY, M.; POHL, T. M.; PRICE, C.; PURNELLE, B.; QUAIL, M. A.; RABBINOWITSCH, E.; REINHARDT, R.; RIEGER, M.; RINTA, J.; ROBBEN, J.; ROBERTSON, L.; RUIZ, J. C.; RUTTER, S.; SAUNDERS, D.; SCHAFER, M.; SCHEIN, J.; SCHWARTZ, D. C.; SEEGER, K.; SEYLER, A.; SHARP, S.; SHIN, H.; SIVAM, D.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; TOSATO, V.; VOGT, C.; VOLCKAERT, G.; WAMBUTT, R.; WARREN, T.; WEDLER, H.; WOODWARD, J.; ZHOU, S.; ZIMMERMANN, W.; SMITH, D. F.; BLACKWELL, J. M.; STUART, K. D.; BARRELL, B. AND MYLER, P. J. **The genome of the kinetoplastid parasite *Leishmania major***. Science 309 (5733): 436-442, 2005.

KAPELLER, I.; MILMAN, N.; YAFFE, N. & SHLOMAI J. **Interactions of a replication initiator with histone H1-like proteins remodel the condensed mitochondrial genome**. J Biol Chem. 286(47): 40566-74, 2011.

KOZIN, M. B. & SVERGUN, D. I. **Automated matching of high- and low-resolution structural models**. J Appl Cryst. 34, 33-41, 2001.

KLINGBEIL, M. M.; DREW, M. E.; LIU, Y.; MORRIS, J. C.; MOTYKA, S. A.; SAXOWSKY, T. T.; WANG, Z.; ENGLUND, P. T. **Unlocking the secrets of trypanosome kinetoplast DNA network replication**. Protist. Dec;152(4):255-62, 2001.

LAIRD, P. W. **Trans splicing in trypanosomes - archaism or adaptation?** Trends Genet. 5(7): 204-208, 1989.

LASKOWSKI, R. A. *et al.* **From protein structure to biochemical function**. Journal of Structural and Functional Genomics, 4: 167-177, 2003.

LEBOWITZ, J. H.; SMITH, H. Q.; RUSCHE, L.; BEVERLEY, S. M. **Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania***. Genes Dev. 7: 996–1007, 1993.

LENZI, H. L., D. N. OLIVEIRA, M. T. LIMA & C. R. GATTASS. ***Trypanosoma cruzi*: paninfectivity of CL strain during murine acute infection**. Exp Parasitol, v.84, n.1, Oct, p.16-27, 1996.

LEVINE, N. D.; CORLISS, J. O.; COX, F. E.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONIGBERG, B. M.; LEEDALE, G. F.; LOEBLICH, A. R.; LOM, J.; LYNN, D.; MERINFELD, E. G.; PAGE, F. C.; POLJANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VAVRA, J. & WALLACE, F. G. **A newly revised classification of the protozoa**. J Protozool, 27 (1), p.37-58, 1980.

LIU, B.; LIU, Y.; MOTYKA, S. A.; AGBO, E. E. C.; ENGLUND, P. T. **Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA**. Trends Parasitol. 21: 363-369, 2005.

LUKES, J.; HINES, J. C.; EVANS, C. J.; AVLIYAKULOV, N. K.; PRABHU, V. P.; CHEN, J. & RAY, D. S. **Disruption of the *Crithidia fasciculata* KAP 1 gene results in structural rearrangement of the kinetoplast disc**. Mol. Biochem. Parasitol. 117: 179-186, 2001.

MAA, Y. F. & HSU C. C. **Performance of sonication and microfluidization for liquid-liquid emulsification**. Pharm Dev Technol. (2): 233-40, 1999.

MACRAE, J. I.; OBADO, S. O.; TURNOCK, D. C.; ROPER, J. R.; KIERANS, M.; KELLY, J. M.; FERGUSON, M. A. **The suppression of galactose metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes causes changes in cell surface molecular architecture and cell morphology**. Mol. Biochem. Parasitol. 147 (1) p. 126-36, 2006.

MADISON-ANTENUCCI, S.; GRAMS, J.; HAJDUK, S. L. **Editing machines: The complexities of trypanosome RNA editing**. Cell 108: 435-438, 2002.

MAHMOOD, R. & RAY, D. S. **Nuclear extracts of *Crithidia fasciculata* contain factors that bind to the 5' untranslated regions of *TOP2* and *RPA1* mRNAs containing sequences required for their cell cycle regulation**. J. Biol. Chem. 273: 23729–23734, 1998.

MAHMOOD, R.; HINES, J. C.; RAY, D. S. **Identification of *cis* and *trans* elements involved in the cell cycle regulation of multiple genes in *Crithidia fasciculata*.** Mol. Cell. Biol. 19: 6174–6182, 1999.

MAIER, D.; FARR, C. L.; POECK, B.; ALAHARI, A.; VOGEL, M.; FISCHER, S.; KAGUNI, L. S. & SCHNEUWLY, S. **Mitochondrial single-stranded DNA-binding protein is required for mitochondrial DNA replication and development in *Drosophila melanogaster*.** Mol. Biol. Cell 12:821–830, 2001.

MAIR, G.; SHI, H.; LI, H.; DJIKENG, A.; AVILES, H. O.; BISHOP, J. R.; FALCONE, F. H.; GAVRILESCU, C.; MONTGOMERY, J. L.; SANTORI, M. I.; STERN, L. S.; WANG, Z.; ULLU, E.; TSCHUDI, C. **A new twist in trypanosome RNA metabolism: *cis*-splicing of pre-mRNA.** RNA 6(2): 163-169, 2000.

MARINI, J. C.; EFFRON, P. N.; GOODMAN, T. C.; SINGLETON, C. K.; WELLS, R. D.; WARTELL, R. M.; ENGLUND, P. T. **Physical characterization of a kinetoplast DNA fragment with unusual properties.** J. Biol. Chem. 259(14): 8974-8979, 1984.

MATTHEWS, K. R.; TSCHUI, C.; ULLU, E. **A common pyrimidine rich motif governs *trans*-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes.** Genes Dev. 8: 491-501, 1994.

McCARTHY-BURKE, C.; TAYLOR, Z. A.; BUCK, G. A. **Characterization of the spliced leader genes and transcripts in *Trypanosoma cruzi*.** Gene 82(1): 177-89, 1989.

MEDINA-ACOSTA, E. & CROSS, G. A. **Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple 'mini-prep' procedure.** Mol. Biochem. Parasitol. 59: 327-329, 1993.

MOREL, C.; CHIARI, E.; CAMARGO, E.; MATTEI, D.; ROMANHA, A.; SIMPSON, L. **Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by restriction endonuclease fingerprinting of kinetoplast DNA minicircles.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 6810-6814, 1980.

NILSEN, T. W. **Trans-splicing in protozoa and helminths.** Infect. Agents Dis. 1(4): 212-218, 1992.

NTAMBI, J. M.; MARINI, J. C.; BANGS, J. D.; HAJDUK, S. L.; JIMINEZ, H. E.; KITCHIN, P. A.; KLEIN, V. A.; RYAN, K. A.; ENGLUND, P. T. **Presence of a bent**

helix in fragments of kinetoplast DNA minicircles from several trypanosomatid species. *Mol. Biochem. Parasitol.* 12(3): 273-286, 1984.

OGBADOYI, E. O.; ROBINSON, D. R.; GULL, K. **A high-order trans-membrane structural linkage is responsible for mitochondrial genome positioning and segregation by flagellar basal bodies in trypanosomes.** *Mol Biol Cell.* (5):1769-79, 2003.

ONN, I.; KAPELLER, I.; ABU-ELNEEL, K.; SHLOMAI, J. **Binding of the universal minicircle sequence binding protein at the kinetoplast DNA replication origin.** *J. Biol. Chem.* 281(49): 37468-37476, 2006.

PASION, S. G.; HINES, J. C.; OU, X.; MAHMOOD, R.; RAY, D. S. **Sequences within the 5' untranslated region regulate the levels of a kinetoplast DNA topoisomerase mRNA during the cell cycle.** *Mol. Cell. Biol.* 16: 6724–6735, 1996.

PEACOCK, C. S.; SEEGER, K.; HARRIS, D.; MURPHY, L.; RUIZ, J. C.; QUAIL, M. A.; PETERS, N.; ADLEM, E.; TIVEY, A.; ASLETT, M.; KERHORNOU, A.; IVENS, A.; FRASER, A.; RAJANDREAM, M. A.; CARVER, T.; NORBERTCZAK, H.; CHILLINGWORTH, T.; HANCE, Z.; JAGELS, K.; MOULE, S.; ORMOND, D.; RUTTER, S.; SQUARES, R.; WHITEHEAD, S.; RABBINOWITSCH, E.; ARROWSMITH, C.; WHITE, B.; THURSTON, S.; BRINGAUD, F.; BALDAUF, S. L.; FAULCONBRIDGE, A.; JEFFARES, D.; DEPLEDGE, D. P.; OYOLA, S. O.; HILLEY, J. D.; BRITO, L. O.; TOSI, L. R.; BARRELL, B.; CRUZ, A. K.; MOTTRAM, J. C.; SMITH, D. F.; BERRIMAN, M. **Comparative genomic analysis of three Leishmania species that cause diverse human disease.** *Nat. Genet.* 39(7): 839-47, 2007.

PORTO-CARREIRO, I.; ATTIAS, M.; MIRANDA, K.; DE SOUZA, W.; CUNHA-E-SILVA, N. **Trypanosoma cruzi epimastigote endocytic pathway: cargo enters the cytostome and passes through an early endosomal network before storage in reservosomes.** *Eur. J. Cell. Biol.* 79: 858-869, 2000.

POVELONES, M. L. **Beyond replication: division and segregation of mitochondrial DNA in kinetoplastids.** *Mol Biochem Parasitol.* 196(1): 53-60, 2014.

RAMACHANDRAN, G. N.; RAMAKRISHNAN, C. & SASISEKHARAN, V. **Stereochemistry of polypeptide chain configurations.** *J. Mol. Biol.* 7: 95–9, 1963.

RAY, D. S. **Conserved sequence blocks in kinetoplast minicircles from diverse species of trypanosomes.** *Mol. Cell. Biol.* 9: 1365–1367, 1989.

REDMOND, S.; VADIVELU, J.; FIELD, M. C. **RNAi: an automated web-based tool for the selection of RNAi targets in *Trypanosoma brucei***. Mol. Biochem. Parasitol. v. 128, p. 115–118, 2003.

ROY CHOWDHURY, A.; BAKSHI, R.; WANG, J.; YILDIRIR, G.; LIU, B.; PAPPAS-BROWN, V.; TOLUN, G.; GRIFFITH, J. D.; SHAPIRO, T. A.; JENSEN, R. E.; ENGLUND, P. T. **The killing of African trypanosomes by ethidium bromide**. PLoS Pathog. (12): e1001226, 2010.

SALI, A. & BLUNDELL, T. L. **Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints**. J Mol Biol. 234(3): 779-815, 1993.

SAMBROOK, J.; FRITSHCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A laboratory manual**. Cold Spring Harbor, N.Y. USA, 1989.

SANCHEZ, R. *et al.* **Protein structure modeling for structural genomics**. Nature Structural Biology, 7: 986-990 2000.

SHAPIRO, T. A. & ENGLUND, P. T. **The structure and replication of kinetoplast DNA**. Annu. Rev. Microbiol. 49: 117-143, 1995.

SHLOMAI, J. **Assembly of kinetoplast DNA**. Parasitol. Today 10: 341-346, 1994.

SIMPSON, L.; SBICEGO, S.; APHASIZHEV, R. **Uridine insertion/deletion RNA editing in trypanosome mitochondria: a complex business**. RNA 9: 265–276, 2003.

SOARES, M.J.; SOUTO-PADRÓN, T; DE SOUZA, W. **Identification of a large prelysosomal compartment in the pathogenic protozoon *Trypanosoma cruzi***. J Cell Sci. 102(1): 157-167, 1992.

SOARES, M.J. **The reservosome of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: an organelle of the endocytic pathway with a role on metacyclogenesis**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 94(1): 139-141, 1999.

SOUZA, M. A. **A simple method to purify biologically and antigenically preserved bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* using Deae-cellulose columns**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 78(3): 317-333, 1983.

STEINDEL, M.; KRAMER PACHECO, L.; SCHOLL, D.; SOARES, M.; DE MORAES, M. H.; EGER, I.; KOSMANN, C.; SINCERO, T. C.; STOCO, P. H.; MURTA, S. M.; DE CARVALHO-PINTO, C. J.; GRISARD, E. C. **Characterization of Trypanosoma cruzi isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil.** *Diagn Microbiol Infect Dis.* 60(1):25-32, 2008.

STUART, K.; FEAGIN, J. E.; ABRAHAM, J. M. **RNA editing: the creation of nucleotide sequences in mRNA—a minireview.** *Gene* 82: 155–160, 1989.

STUART, K. **RNA editing in trypanosomatid mitochondria.** *Annu. Rev. Microbiol.* 45: 327-344, 1991.

STUART K.D.; SCHNAUFER, A.; ERNST, N.L.; PANIGRAHI, A.K. **Complex management: RNA editing in trypanosomes.** *Trends Biochem. Sci.* 30(2): 97-105, 2005.

SVERGUN D. I. **Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria.** *J. Appl. Crystallogr.* 25, 495-503, 1992.

SVERGUN, D. I. **Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing.** *Biophys J.* 76(6): 2879-86, 1999.

SVERGUN, D. I.; PETOUKHOV, M. V. & KOCH, M. H. **Determination of domain structure of proteins from X-ray solution scattering.** *Biophys J.* 80(6): 2946-53, 2011.

TANOWITZ, H. B., L. V. KIRCHHOFF, D. SIMON, S. A. MORRIS, L. M. WEISS & M. WITTNER. **Chagas' disease.** *Clin Microbiol Rev*, v.5, n.4, Oct, p.400-19, 1992.

TOWBIN, H.; STAEBLIN, T.; BORDON, J. **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.** *Proc. Natl. Acad. USA* 76: 4350-4354, 1979.

ULLU, E. & TSCHUDI, C. **Trans splicing in trypanosomes requires methylation of the 5' end of the spliced leader RNA.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88(22): 10074-10078, 1991.

ULLU, E.; DJIKENG, A.; SHI, H.; TSCHUDI, C. **RNA interference: advances and questions.** Phil Trans R Soc Lond B. 357: 65–70, 2002.

VANHAMME, L. & PAYS, E. **Control of Gene Expression in Trypanosomes.** Microbiol. Rev. 59(2): 223–240, 1995.

WANG, J.; PAPPAS-BROWN, V.; ENGLUND, P. T. & JENSEN, R. E. **TbKAP6, a mitochondrial HMG box-containing protein in *Trypanosoma brucei*, is the first trypanosomatid kinetoplast associated protein essential for kinetoplast DNA replication and maintenance.** Eukaryot Cell. 13(7):919-32, 2014.

WICKSTEAD, B.; ERSFELD, K.; GULL, K. **Targeting of a tetracycline-inducible expression system to the transcriptionally silent minichromosomes of *Trypanosoma brucei*.** Mol. Biochem. Parasitol. v. 125, p.211–216, 2002.

WIRTZ, E.; LEAL, S.; OCHATT, C.; CROSS G. A. **A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*.** Mol. Biochem. Parasitol. 99, 89–101, 1999.

WOODWARD, R. & GULL, K. **Timing of nuclear and kinetoplast DNA replication and early morphological events in the cell cycle of *Trypanosoma brucei*.** J Cell Sci. Jan;95 (Pt 1):49-57, 1990.

XU, C. & RAY, D. S. **Isolation of proteins associated with kinetoplast DNA networks *in vivo*.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 1786-1789, 1993.

XU, C. W.; HINES, J. C.; ENGEL, M. L.; RUSSEL, D. G.; RAY, D. S. **Nucleus-encoded histone H1-like proteins are associated with kinetoplast DNA in the trypanosomatid *Crithidia fasciculata*.** Mol. Cell. Biol. 16: 564-576, 1996.

ZAVALA-CASTRO, J. E.; ACOSTA-VIANA, K.; BAYLON-PACHECO, L.; GONZÁLEZ-ROBLES, A.; GUZMÁN-MARÍN, E.; ROSALES-ENCINA, J. L. **Kinetoplast DNA-binding protein profile in the epimastigote form of *Trypanosoma cruzi*.** Arch. Med. Res. 33(3):250-256, 2002.

ZICK, A.; ONN, I.; BEZALEL, R.; MARGALIT, H.; SHLOMAI, J. **Assigning functions to genes: identification of S-phase expressed genes in *Leishmania major* based on post-transcriptional control elements.** Nucleic Acids Res. 33: 4235-4242, 2005.

ZINGALES, B.; PEREIRA, M. E.; OLIVEIRA, R. P.; ALMEIDA, K. A.; UMEZAWA, E. S.; SOUTO, R. P.; VARGAS, N.; CANO, M. I.; DA SILVEIRA, J. F.; NEHME, N. S.; MOREL, C. M.; BRENER, Z.; MACEDO, A. ***Trypanosoma cruzi* genome project: biological characteristics and molecular typing of clone CL Brener.** Acta Trop. 68(2): 159-173, 1997.

ZWIERZYNSKI, T. A. & BUCK, G. A. **RNA-protein complexes mediate *in vitro* capping of the spliced-leader primary transcript and U-RNAs in *Trypanosoma cruzi*.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88(13): 5626-5630, 1991.